

Mészáros Éva

**Tetra- és triklóretén talajvíz-szennyezők lebontásában
résztevő anaerob mikrobaközösségek vizsgálata**

Doktori értekezés



Témavezető:

Dr. Márialigeti Károly
egyetemi tanár

Doktori Iskola vezető:
Dr. Jánosi Imre
egyetemi tanár

Programvezető:
Dr. Ács Éva
tudományos tanácsadó

ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék
Budapest
2015.

„A természet csak homlokába tett
Látó szemet, hátát, a védtelent,
Csupán jámbor hűség védi meg.”

Friedrich Schiller

I. Tartalomjegyzék

I.	Tartalomjegyzék	3
II.	Rövidítésjegyzék	6
III.	Bevezetés	7
IV.	Irodalmi áttekintés	9
	4.1. Klórozott etének	9
	4.2. Kármentesítési lehetőségek	10
	4.3. Biológiai remediáció lehetősége a halogénezett szénhidrogének esetében	12
	4.3.1. Biostimuláció	14
	4.3.2. Bioaugmentáció	15
	4.4. Mikrobiológiai deklorinációs útvonalak	16
	4.4.1. Oxidatív dehalogenáció	16
	4.4.1.1. Energiaszerzés halogénezett szénhidrogének oxidációjával	16
	4.4.1.2. Kometabolikus oxidáció	17
	4.4.2. Fermentatív dehalogenáció	17
	4.4.3. Reduktív dehalogenáció	18
	4.4.3.1. Kometabolikus reduktív dehalogenációs folyamatok	18
	4.4.3.2. Energiaszerző redukció - dehalorespiráció	19
	4.5. A dehalogenációs mechanizmus termodinamikai valószínűsége anaerob ökoszisztémákban	20
	4.6. A dehalogenációban résztvevő mikrobák	21
	4.7. Reduktív dehalogenázok	25
	4.8. Abiotikus reduktív deklorináció	27
	4.9. Rövidszénláncú alifás klórozott szénhidrogének bontásában résztvevő mikrobaközösségeket vizsgáló molekuláris módszerek	28
	4.9.1. ARDRA – amplifikált riboszómális DNS restrikciós analízise	29
	4.9.2. DGGE – denaturáló gradiens gélelektroforézis	29
	4.9.3. T-RFLP – terminális restrikciós fragmenthossz polimorfizmus	30
	4.9.4. SNUPE – Single-NucleotidePrimer Extension módszer	31
	4.9.5. Real-time PCR – valós idejű kvantitatív PCR	34
	4.9.6. FISH – fluorescens <i>in situ</i> hibridizáció	36
	4.10. Mikrokozmosz kísérletek	37
V.	Célkitűzések	40
VI.	Anyag és módszer	43
	6.1. A minták származási helye	43

6.1.1. Az Archaea diverzitás-vizsgálatokhoz és a háromfázisú mikrobiokozmoszok összeállításához használt minták származási helye	43
6.1.2. Bitterfeld/Wolfen terület	45
6.2. Mintavétel	46
6.2.1. Talajvíz mintavétel az Archaea diverzitás-vizsgálatokhoz	46
6.2.2. <i>Dehalococcoides</i> diverzitás-elemzés mintái	46
6.2.2.1. Talajvíz és mesterséges lép	46
6.2.2.2. Mikrobiokozmoszok és dúsítók	47
6.2.3. Háromfázisú mikrobiokozmoszokhoz használt minták vétele	48
6.3. A kísérletek összeállítása	48
6.3.1. A <i>Dehalococcoides</i> diverzitás-vizsgálathoz használt mikrobiokozmoszok és dúsító kultúrák	48
6.3.2. Dúsító kultúrák létrehozása a SNUPE módszer fejlesztéshez	49
6.3.3. Háromfázisú mikrobiokozmoszok összeállítása	50
6.4. Kémiai vizsgálatok	52
6.4.1. Talajvízminták vizsgálata	52
6.4.2. Gázkromatográfiás módszerek	52
6.4.2.1. A németországi mikrobiokozmosz minták elemzése	52
6.4.2.2. A magyarországi mikrobiokozmosz minták elemzése	53
6.5. Nukleinsav kivonás	54
6.5.1. DNS izolálás	54
6.5.2. RNS izolálás	55
6.6. Polimeráz láncreakció (PCR)	56
6.6.1. 16S rRNS Bacteria specifikus PCR	56
6.6.2. 16S rRNS Archaea specifikus PCR	57
6.6.3. Taxon-specifikus PCR	57
6.6.4. A redukzív dehalogenáz gének vizsgálata	58
6.7. Kalibrációs eljárások a <i>Dehalococcoides</i> diverzitás-vizsgálatok során	58
6.8. Az új módszer fejlesztése – primer tervezés, csoport-specifikus PCR, SNUPE	60
6.8.1. Csoport-specifikus PCR	62
6.8.2. SNUPE	63
6.9. Reverz transzkripció	64
6.10. T-RFLP elemzés	64
6.10.1. Archaea közösség elemzés	64
6.10.2. Bacteria közösség elemzés	66
6.11. Klónkönyvtár létrehozása	67
6.12. Bázissorrend elemzés	68
6.13. Filogenetikai vizsgálatok	69

6.14. Statisztikai módszerek	70
VII. Eredmények és értékelésük	72
7.1. Az <i>in situ</i> biostimulációs beavatkozás és az Archaea diverzitás-vizsgálatok eredményei	72
7.1.1. Az <i>in situ</i> biostimulációs beavatkozás kémiai eredményei	72
7.1.2. Az Archaea diverzitás-vizsgálatok biológiai eredményei	79
7.2. A <i>Dehalococcoides</i> diverzitás-vizsgálatok eredményei	87
7.2.1. 16S rRNS <i>Dehalococcoides</i> sp. gének	87
7.2.2. Direkt szekvenálás	87
7.2.3. RDáz gének	90
7.2.3.1. A <i>tceA</i> gének	90
7.2.3.2. A <i>vcrA</i> és <i>bvcA</i> gének	91
7.3. A SNUPE módszer fejlesztés eredményei	94
7.3.1. A mikrokozmoszok kémiai eredményei	94
7.3.2. A klónokat elkülönítő SNUPE próbák	96
7.3.2.1. Az 1. RDáz csoport eredményei	96
7.3.2.2. A 2. RDáz csoport eredményei	97
7.3.3. Az RDáz csoportok kimutatása a különböző típusú mikrokozmoszokban	98
7.4. A háromfázisú mikrokozmoszok eredményei	102
7.4.1. TCE és bomlástermékeinek vizsgálata	102
7.4.2. Taxon-specifikus kimutatások	104
7.4.3. RDáz gének vizsgálata	105
7.4.4. A háromfázisú mikrokozmoszok T-RFLP eredményei	105
VIII. Összefoglaló értékelés	108
IX. Összefoglalás	115
X. Summary	117
XI. Melléklet	119
XII. Hivatkozások jegyzéke	129
XIII. Köszönetnyilvánítás	141

II. Rövidítésjegyzék

ARDRA – amplifikált riboszómális DNS restrikciós analízise

BTEX – benzol, toluol, etilbenzol és xilolok

CCoA – kanonikus korrespondencia elemzés (Canonical Correspondence Analysis)

DC – *Desulfuromonas chloroethenica*

DCE – diklóretén (c-DCE – *cisz*-DCE, t-DCE – *transz*-DCE)

DD – *Desulfitobacterium dehalogenans*

ddNTP – dideoxinukleotid trifoszfát

DGGE – denaturáló gradiens gélelektroforézis

DHC – *Dehalococcoides* sp.

DNAPL – víznél nagyobb sűrűségű, vízzel nem elegyedő folyadék fázis (Dense Non-Aqueous Phase)

DR – *Dehalobacter restrictus*

DT – *Desulfomonile tiedjei*

EOV – egységes országos vetület

FID – lángionizációs detektor (Flame Ionization Detector)

GC – gázkromatográfia

HEX – hexakloro-fluoreszcein

HOPE – Hierarchial Oligonucleotide Primer Extension

HDPE – nagy sűrűségű polietén (High-Density Polyethene)

HRB – halorespiráló baktériumok

OTU – taxonómiai egység (Operational Taxonomic Unit)

PAST – Paleontological Statistics Software Package

PCA – főkomponens elemzés (Principal Component Analysis)

PCE – perklóretén

PCR – polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction)

PTFE – politetrafluoretén

PVC – poli(vinil-klorid)

RDáz – redukzív dehalogenáz

SSCP – egyszálú konformációs polimorfizmus

SNuPE – Single-Nucleotide Primer Extension

TCE – triklóretén

TOC – összes szerves szén (Total Organic Carbon)

T-REX- T-RFLP Analysis Expedited

T-RFLP – terminális restrikciós fragmenthossz polimorfizmus

VC – vinil-klorid

VOC – illékony szerves vegyület (Volatile Organic Compound)

III. Bevezetés

A múlt század elejétől jelentősen megnövekedett ipari, mezőgazdasági és katonai tevékenység óriási mértékű környezetszennyezést idézett elő világszerte. A környezetbe jutott számos antropogén eredetű vegyület komoly kihívást jelent a környezet számára, mivel a természetes rendszerek nem adaptálódtak ezeknek az anyagoknak a gyors lebontásához. Magyarországon a 80-as évek elején történt vízszennyezések hívták fel a figyelmet a földtani közeg és a felszín alatti víz szennyezés felmérésének fontosságára, a szennyezett területek számbavételére és a károk felszámolására, illetve ennek jogi szabályozására (*Puzder és mtsai 2001*).

A halogénezett szénhidrogének, köztük a klórozott rövid szénláncú vegyületek (pl. tetraklórétén [PCE], triklórétén [TCE], diklórétén [DCE], vinil-klorid [VC], széntetraklorid, kloroform, diklórmetán és klórmetán) a leggyakoribb talajvíz-szennyezők közé tartoznak Magyarországon (több ezer szennyezett helyszín található hazánkban). Egykor széleskörűen használták azokat az iparban, a mezőgazdaságban és a háztartásokban oldószerként, csíraölőként és zsírtalanítóként. Akut és krónikus mérgezőképességük (néhányak karcinogének, károsak a vesére, a májra, és a tüdőre), a környezetben való felhalmozódásuk, nehézkes lebomlásuk miatt e vegyületek nagy gondot jelentenek mind a természetes környezetre, mind ránk, emberekre nézve.

Az előbb említett klórozott szénhidrogének a víznél nagyobb sűrűségűek, ezért a talajvíz szintje alá is leszivárognak a talajba. Vízben különböző mértékben oldódnak, ha nagy mennyiségben vannak jelen, akkor a vízzel kétfázisú rendszert alkotnak és a vizes fázis alatt helyezkednek el („DNAPL – Dense Non-Aqueous Phase Liquid” – víznél nagyobb sűrűségű, vízzel nem elegyedő folyékony fázis). Fiziko-kémiai tulajdonságaik miatt –

főleg a többszörösen halogénezett szénhidrogének – akkumulálódhatnak anoxikus ökoszisztémákban: üledékben, iszapban, talajban és talajvízben (*Smidt és de Vos 2004*). A szennyezők kis koncentrációban folyamatosan beoldódhatnak a talajvízbe, hosszú időre elszennyezve a területet. A talajvíz áramlásával a szennyezés igen messzire eljuthat a forrásától, ivóvízbázisokat veszélyeztethetve. Az oldhatóságuk jelentősen meghaladja az ivóvizekben megengedett maximális koncentrációt.

A felszín alatti vizek védelme, illetve a nagy elterjedtségű és jelentős mérgezőképességű klórozott szénhidrogén szennyeződéstől való kármentesítése kiemelt fontosságú, hiszen Magyarországon az ivóvízellátás 95%-a felszín alatti vizekből történik (*Nemzeti Környezetügyi Intézet, www.neki.gov.hu*).

IV. Irodalmi áttekintés

4.1. Klórozott etének

A klórozott szénhidrogének a leggyakoribb talajvízrendszerekben megfigyelt szennyezők között vannak világszerte (*Bradley 2003, Christ és mtsai 2005, Löffler és Edwards 2006, Moran és mtsai 2007*), melyek hajlamosak felhalmozódni anaerob felszín alatti környezetekben (*Smidt és de Vos 2004, Löffler és Edwards 2006*).

A klórozott etének két nagy csoportra oszthatók, a többszörösen klórozott etének közé tartozik a PCE és a TCE, a részlegesen klórozott etének közé pedig a DCE és VC. A PCE-nek és a TCE-nek magas a forráspontja, lipofilek, volatilisek és nem gyúlékonyak, ami kitűnő oldószerre teszi őket. E tulajdonságaiknak köszönhetően használják őket extrakciós folyamatokban, oldószerként, fémek zsírtalanításra és vegytisztítás során. A VC-nak eltérő jellemzői vannak. Gyúlékony gáz, fő ipari felhasználása a poli(vinil-klorid) (PVC) gyártása (*Euro Chlor, 1997, 1999*).

Minden alifás klórozott etén toxikus, a VC bizonyítottan humán karcinogén (*Kiellhorn és mtsai 2000*).

A napjainkban, e veszélyes vegyületek eltávolítására alkalmazott remediációs technológiák bonyolultak és igen költségesek. Egy lehetséges megoldást jelenthetne az *in situ* bioremediációs technikák alkalmazása, melynek során a dehalogénező baktériumok bontási képességeit használjuk ki. Míg a többszörösen klórozott etének nem bomlanak le aerob körülmények között, addig anaerob körülmények között részlegesen klórozott eténekké, illetve teljesen ártalmatlan eténné alakíthatóak (*Holliger és mtsai 1999, Smidt és de Vos 2004*).

4.2. Kármentesítési lehetőségek

Ma már számos kármentesítési (remediációs) technológia ismert a szennyezett területek megtisztítására, amelyek közül a szennyezésnek és a helyi paramétereknek megfelelőt kell kiválasztani.

Az eljárásokat a helyszín szerint, alapvetően két csoportba sorolhatjuk:

in situ (= eredeti helyzetben) megoldások: Azok az eljárások tartoznak ide, amelyek során a szennyeződött talajt és/vagy talajvizet olyan eljárásokkal tisztítják meg a szennyezést okozó anyag(ok)tól, amelyekkel a tisztítás során nem szükséges kitermelni a földtani közeget. A felszín alatti vizet forgatják és visszanyeletik a földtani közegben.

ex situ (= nem eredeti helyzetben) megoldások: Az ebbe a csoportba tartozó technológiákat további két alcsoportba lehet osztani:

- *ex situ on site:* a földtani közeget kitermelik és tisztítják. A kitermelt szennyezett talajt és/vagy talajvizet nem szállítják el, hanem a munkaterületen tisztítják bioágyakon, termikusan, vagy talajmosással, majd a megtisztított talajt és/vagy felszín alatti vizet visszahelyezik a munkagödörbe.
- *ex situ off site:* a szennyezett talajt, és a talajvizet nem a munkaterületen belül kezelik, hanem egy távolabbi tisztító telepre szállítják, ott megtisztítják, majd a kezelt talajt juttatják vissza az eredeti munkagödörbe. A megtisztított felszín alatti vizet élővízbe vagy közcsatornába vezetik.

A kármentesítési módszereket lehet a tisztítási elv szerint is csoportosítani:

- mechanikai
- kémiai
- termikus
- biológiai
- illetve egyéb (pl. fizikai-kémiai, elektrokémiai, stb.).

Talaj, üledék és egyéb nagy szárazanyag tartalmú szennyezett tömegek kármentesítésénél alkalmazott *fizikai-kémiai* eljárások pl. kémiai oxidáció/redukció, talajmosás, talajgáz-kitermelés és detoxikáció napfényben. Felszín alatti vizek, csurgalék- és mosóvizek remediációjánál alkalmazott *fizikai-kémiai* eljárások pl. levegőbefuvatás és levegősztrippelés (Puzder és mtsai 2001).

A *biológiai* remediáció olyan eljárás, amely élő szervezetek degradációs, illetve átalakító képességét állítja a technológia középpontjába. Az eljárás során az élő szervezetek enzimrendszerük segítségével bontják le az életidegen anyagokat (xenobiotikumokat) energiaforrásként használva azokat.

In situ biológiai eljárások:

- *természetes szennyezőanyag csökkenés:* a földtani közegben és/vagy a felszín alatti vízben spontán megindul a biodegradáció.
- *bioventilláció:* aerob biodegradáció során a szükséges oxigénmennyiség biztosítását a talajlevegő folyamatos cseréjével érik el.
- *természetes biodegradáció fokozása:* a jelenlévő mikrobák aktivitásának növelése érdekében tápanyagokat és oxigént juttatnak a talajba és/vagy a talajvízbe, a szennyezők biológiai hozzáférhetőségét felületaktív anyagokkal biztosítják (US EPA 2002).

Az in situ biológiai kármentesítés előnyei:

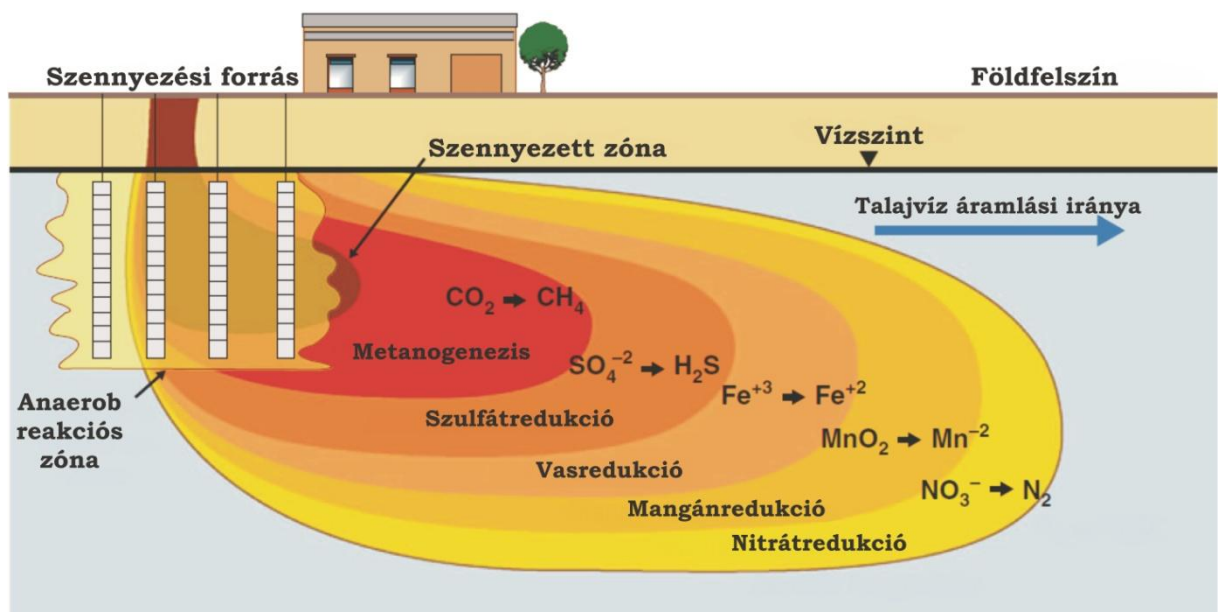
- helyben kivitelezhető
- a környezet csak minimálisan változik meg
- szállítási költségeket meg lehet takarítani
- élő szervezetekkel végzett kármentesítés esetén „önfenntartó”
- a hosszú távú kiadások csökkenthetőek
- általában olcsóbb, mint más kármentesítő eljárások
- kombinálható más remediációs technikával
- a sikeres eljárás során a szennyező anyagok ártalmatlan végtermékekké, pl. szén-dioxiddá és vízzé alakulnak és nem csak elszállítódnak a környezet más részébe.

4.3. Biológiai remediáció lehetősége a halogénezett szénhidrogének esetében

Számos halogénezett szerves vegyületről még néhány évvel ezelőtt is azt feltételezték, hogy xenobiotikum, miközben e vegyületek nagy mennyiségben keletkeznek a természetes szárazföldi rendszerekben (*Smidt és de Vos 2004*). Kimutattak például reduktív dehalogenációt végző mikrobákat bróm-fenol termelő tengeri szivacsról (*Aplysina aerophoba*) (*Ahn és mtsai 2003*). Abiotikus úton is keletkezhetnek klórozott szénhidrogének, pl. vulkanikus tevékenység, illetve erdőtűz során. Mostanáig több mint 3000 természetes úton keletkezett halogénezett szénhidrogént azonosítottak (*Hägglom és Bossert 2003*). Ezen vegyületek biogeokémiai ciklusa az őket lebontó mikrobák működésétől függ. Ezek a kutatási eredmények azt sugallták, hogy a halogénezett szerves xenobiotikumok lebontását a dehalogenációt végző mikrobákra kellene alapozni bioremediációs eljárások során, így elkerülhetjük a szennyező anyagok felhalmozódását.

Az aerob és az anaerob energiaszerző (katabolikus) biodegradációs anyagcsereutakat tartják a legfőbb biológiai folyamatoknak, amelyek képesek

jelentősen csökkenteni a szennyezőanyag koncentrációját, szemben a kometabolikus folyamatokkal. Az *aerob biodegradáció* során az oldott oxigén szolgál elektron akceptorként a mikroorganizmusok számára. Az *anaerob* folyamatok széles skálája található meg a biodegradáció során, ahol a terminális elektron akceptor lehet pl. nitrát, vas (III), szulfát és szén-dioxid. A szennyezett területeken általában az anaerob folyamatok dominálnak, mivel nagyobb mélységekben az oxigén már nem elérhető elektron akceptor a mikroorganizmusok számára (Kao és Prosser 1999).



1. ábra: Redukáló zónák a szennyezett területen (Forrás: Henry 2010).

A környezeti feltételek és a mikrobiális kompetíció egyértelműen meghatározzák, mely anaerob biodegradációs folyamatok dominálhatnak (1. ábra). Egy tipikus anoxikus talajvíz rétegben először a denitrifikációs folyamatok jelennek meg, ezt követik a vasredukciós folyamatok, majd a szulfátredukció, végül a metanogenezis (Kao és Prosser 1999).

4.3.1. Biostimuláció

A biostimuláció magába foglalja a klórozott vegyületek anaerob degradációjának serkentését fermentálható szerves szubsztrát vagy egyszerű elektron donorok (pl. hidrogén, acetát) adagolásával abból a célból, hogy ezzel stimulálják a helyszínen őshonos mikrobák növekedését és aktivitását. Néhány esetben, mikroorganizmusok beadagolása is szükséges (bioaugmentáció), ha az őshonos mikroba populáció nem képes hatékony dehalogenációra.

A biostimuláció előnye, hogy *in situ* kivetelelhető, nem igényel komolyabb infrastruktúrát, alacsonyabb költséggel jár, mint más, műszaki megoldásokat is igénylő remediációs eljárás. Ugyanakkor korlátai is vannak ennek az eljárásnak, mint például a köztes bomlástermékek esetleges felhalmozódása vagy a technológia időigényessége.

Számos ipari mellékterméket adagolnak szubsztrátként, úgy, mint melasz, növényi olajok vagy savó. Kevésbé komplex szubsztrátként laktátot, butirátot és etanolt adagolnak, amikor sokkal specifikusabb fermentációs reakciót céloznak meg. Ezen szubsztrátokból alacsony molekulású szerves savak (propionsav és esetsav) szabadulnak fel a biodegradáció során, amelyekből hidrogén, mint elsődleges elektron donor keletkezik fermentációs útvonalon. Többféle szubsztrát egyidejű alkalmazása egyre elterjedtebbé válik. Például egy könnyen eloszló, gyorsan degradálható, oldékony szubsztrát, mint a laktát kombinálható egy lassan felszabaduló szubsztráttal, mint a növényi olaj (Henry 2010).

Az elektron donor forrásokon kívül egyéb szubsztrát adagolás is alkalmazható biostimulációs eljárásban. Ezek a másodlagos adagolások lehetnek szerves tápanyagok, amelyek a mikrobák növekedését serkentik, pH-t szabályozó vegyületek, vagy szerves adalékanyagok, amelyek biogeokémiai folyamatokat stimulálnak. Egy szubsztrát adagolás során a megnövekedett mikrobiális aktivitás miatt további tápanyagok bejuttatása is

szükségeses lehet, általában nitrogént, foszfort, káliumot és élesztő kivonatot adagolnak.

4.3.2. Bioaugmentáció

Számos esetben a biostimuláció elég hatékony a klórozott vegyületek teljes anaerob reduktív deklorinációjához. Ugyanakkor, bioaugmentációra lehet szükség az autochton deklorinálók hiányában, vagy alacsony sejtszámnál. A bioaugmentáció mikroorganizmusok talajba, illetve talajvízbe való bejuttatása. Napjainkra számos bioaugmentációs kísérletet végeztek klórozott etének deklorinációjának serkentésére (*Lendvay és mtsai 2003, Major és mtsai 2002*).

Számos molekuláris módszert fejlesztettek annak felmérése, hogy egy szennyezett területen jelen vannak-e a klórozott etének lebontásában részt vevő baktériumok (*Löffler és mtsai 2000, Müller és mtsai 2004*). Az így nyert információval lehetőség van megbecsülni a bioaugmentáció szükségességét.

A kereskedelembe elérhető *Dehalococcoides* szervezeteket tartalmazó, teljes deklorinációra képes kevert kultúrák, mint például KB-1® (amit a torontói egyetemen fejlesztettek ki), Bachman Road kultúra vagy Pinellas kultúra.

Bioaugmentációs és biostimulációs beavatkozást hasonlítottak össze *Lendvay és mtsai (2003)* egy klórozott eténnel szennyezett teszt területen. Molekuláris biológiai vizsgálatokkal bizonyították *Dehalococcoides* szervezetek jelenlétét a területen. Bioaugmentációt végeztek az őshonos deklorináló szervezetekkel (amelyeket laboratóriumi körülmények között szaporítottak fel). Ennek eredményeképpen hat héten belül teljes reduktív deklorinációt figyeltek meg. A biostimulációs eljárás során laktátot, foszfátot és nitrátot adagoltak be. Ennek hatására szintén teljes reduktív deklorináció volt megfigyelhető, ám csak három hónapos lag fázis után. Valós idejű kvantitatív PCR-rel megállapították, hogy a bioaugmentáció során a *Dehalococcoides* szervezetek sejtszáma 3-4-szeresére növekedett. A biostimuláció során sokkal lassabb és kisebb mértékű

sejtszám növekedést figyeltek meg. Megállapították, hogy a bioaugmentáció során megfigyelt deklorináció a *Dehalococcoides* szervezetek jelenlétéhez volt köthető, a bioaugmentáció lecsökkentette a deklorináció lag fázisát, és, hogy biostimulációs eljárással teljes reduktív deklorinációt lehet elérni olyan területeken, ahol autochton *Dehalococcoides* szervezetek vannak jelen.

4.4. Mikrobiológiai deklorinációs útvonalak

Számos kevert és tiszta kultúrával végzett vizsgálat bizonyítja, hogy a klórozott etének bontásában a fő mechanizmus az anaerob reduktív dehalogenáció folyamata, de előfordul oxidatív és fermentatív mechanizmus is oxigén hiányos környezetben. A mikrobiális dehalogenációra úgy is tekinthetünk, mint egyfajta új adaptációra a szén- és energiaforrások elérésében (Lee és mtsai 1998).

4.4.1. Oxidatív dehalogenáció

Számos proteobaktérium tiszta tenyészet (pl. *Thauera* sp., *Pseudomonas* sp. és *Ochrobacterium* sp.) bontja a 3-klórbenzoátot és denitrifikáló környezetben egyedüli szén- és energiaforrásként használja fel anyagcseréjében (Smidt és de Vos 2004). Leírtak egy *Pseudomonas stutzeri* baktériumtörzset, amelyről elsőként bizonyították, hogy anoxikus, nitrát hiányos környezetben képes oxidatív deklorinációval bontani a 2-klóretanolt. Ezt a szervezetet egy 1,2-diklóretánt deklorináló, denitrifikáló dúsító kultúrából izolálták (Dijk és mtsai 2003).

4.4.1.1. Energiaszerzés halogénezett szénhidrogének oxidációjával

A VC-ot, a reduktív dehalogenáció egyik termékét, olyan aerob baktériumok képesek CO₂-dá alakítani, mint pl. *Mycobacterium aurum* L1 törzs (Hartmans és de Bont 1992), *Pseudomonas aeruginosa* MF1 törzs (Verge és mtsai

2000) és *Ralstonia* sp. (Elango és mtsai 2006). Metanogén mikrobaközösség anaerob diklór-metán lebontását is kimutatták (Lee és mtsai 1998). *Polaromonas* sp. JS666 volt az első aerob izolátum, ami képes volt c-DCE-t egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani (Mattes és mtsai 2008) oxidatív dehalogenáció során.

4.4.1.2. Kometabolikus oxidáció

A metanotróf baktériumok, amelyek rendelkeznek monooxygenáz és dioxigenáz enzimekkel, nagy számban találhatók a természetben, beleértve a talajvizeket is. Ezek az enzimek oxidatíván bontják a részlegesen klórozott vegyületeket, pl. TCE-t, cisz-diklóretént (c-DCE) vagy VC-ot, toluol, fenol, metán vagy propán normál oxidációja közben. Ugyanakkor, a teljesen klórozott PCE rezisztens az ilyen mechanizmussal lejátszódó lebontásra (Fries és mtsai 1997, Lee és mtsai 1998).

A természetben korlátozó tényező lehet az oxigén-igény és a ko-szubsztrát igény (pl. metán vagy valamilyen aromás vegyület), viszont kármentesítésben, ahol esetleg biztosítani tudjuk az elérhető oxigént és a szénhidrogéneket ez egy sikeres lebontási útvonal lehet (Smidt és de Vos 2004).

4.4.2. Fermentatív dehalogenáció

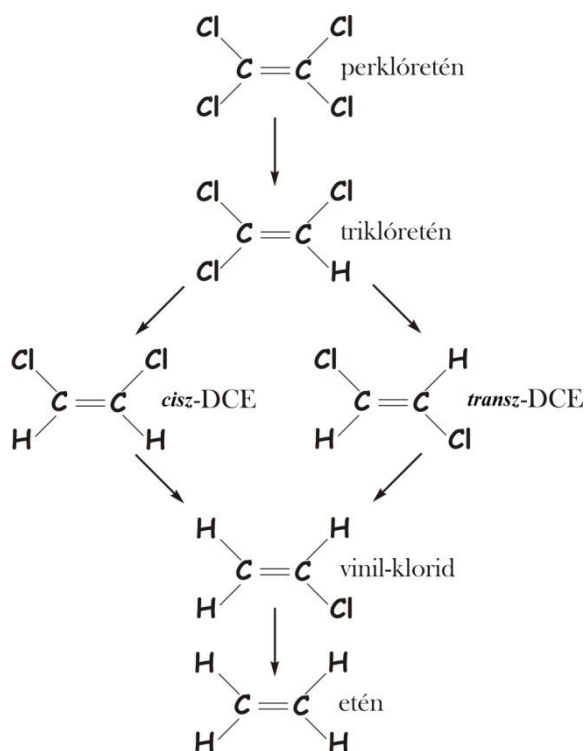
Két homoacetogén baktériumról írták le, hogy tiszta tenyészetben alifás halogénezett szerves vegyületeket használnak egyedüli szén- és energiaforrásként. A *Dehalobacterium formicoaceticum* a diklórmétánt fermentálja acetáttá és formiáttá (Magli és mtsai 1996), az *Acetobacterium dehalogenans* klórmétánt bont és acetátot állít elő fermentációs végtermékként (Traunecker és mtsai 1991). Továbbá bizonyítást nyert, hogy a halogénezett etének, etánok, valamint a VC bontása fermentatív dehalogenáció során is történhet (Smidt és de Vos 2004).

4.4.3. Reduktív dehalogenáció

Anaerob körülmények között az energiaszerző *reduktív dehalogenáció* során egy klór helyére hidrogén kerül a szénhidrogénekben (2. ábra). Ez a reakció történhet kometabolikus és metabolikus útvonalon. Az előbbi valószínűleg nagyrészt fém ion-tartalmú, hőstabil tetrapirrolok, vagy enzimek katalizálják, az utóbbit halorespiráló baktériumokban (HRB) mutatták ki (*Smidt és de Vos 2004*).

4.4.3.1. Kometabolikus reduktív dehalogenációs folyamatok

A PCE-t is és a TCE-t is számos anaerob baktérium – köztük sok metanogén, acetogén faj és szulfátredukáló baktériumok – képes reduktív dehalogenációval bontani (*Maymo-Gatell és mtsai 1995*). Ezen baktériumok a reakciót nem energiaszerző, hanem *kometabolikus* útvonalon végzik. A kometabolizmus egy vegyület olyan enzimek vagy kofaktorok általi véletlenszerű módosítása, amelyek normális esetben más reakciókat katalizálnak. A mikroorganizmusok nem nyernek energiát a kometabolikus átalakulásból, a szennyezőanyagok redukciója csak egy rész-reakció. Mindamellet a természetben, ahol nagy a szerves anyag mennyiség és intenzív a metanogenezis és szulfátlégzés, a részleges kometabolikus deklorináció lehet a legjellemzőbb folyamat (*Lee és mtsai, 1998*).



2. ábra: A deklorináció folyamata.

4.4.3.2. Energiaszerző redukció – dehalorespiráció

Számos laboratóriumban bizonyították, hogy léteznek új, halorespiráló törzsek, amelyek a PCE-t, a TCE-t vagy a klórbenzoátot használják elektron akceptorként a biológiai energiaszerzésben. Ilyenek például a *Desulfomonile tiedjei* (Griffith és mtsai 1992), a „*Dehalococcoides ethenogenes*” (He és mtsai 2003) a *Desulfitobacterium chlororespirans* (Sanford és mtsai 1996), és a *Dehalobacter restrictus* (Holliger és mtsai 1998). Ezek a szervezetek azonban eltérnek az anaerob szulfátredukáló és metanogén kometabolikus deklorinálóktól. Egyes fajok c-DCE-t állítanak elő végtermékként, míg mások teljes deklorinációt végeznek eténig (Lee és mtsai 1998). A szennyezett területen a legfőbb problémát a nem teljesen végbemenő reakció és a VC akkumulálódása okozza, mivel a kevésbé klórozott etének toxikusabbak, mint a PCE vagy a TCE.

4.5. A dehalogenációs mechanizmus termodinamikai valószínűsége anaerob ökoszisztémákban

A halogénezett vegyületek kitűnő elektron akceptorok lehetnek. Egy klór eltávolítása a hidrogenolitikus redukzív dehalogenáció során -130 kJ/mol és -180 kJ/mol közötti energia felszabadulásával jár (Smidt és de Vos 2004).

A terminális elektron akceptor energetikán alapuló folyamatot a minimális H_2 koncentráció-fogyasztás szabályozza. Lovley és Goodwin bizonyították, hogy a „steady-state” H_2 küszöb koncentrációt a H_2 fogyasztó organizmusok fiziológiai tulajdonságai szabályozzák és független a H_2 -termelés vagy H_2 -fogyasztás kinetikájától (Lovley és Goodwin 1988). Ez a modell azt jósolja, hogy a H_2 „steady-state” küszöb koncentráció a következő sorrendet követi:

acetogenezis > metanogenezis > szulfátredukció > Fe (III) redukció > Mn (IV) redukció > denitrifikáció.

A klororespiráló - klórozott szerves vegyületeket redukáló - baktériumok is fogyasztanak H_2 -t, de a számukra optimális hidrogén parciális nyomásról a szakirodalomban sem találunk egységes véleményeket. Löffler és munkatársai (1999) szerint a küszöb koncentráció alacsonyabb, mint az acetogéneké, a metanogéneké és szulfátredukálóké és valószínűleg a denitrifikációhoz van közel, míg más irodalmak szerint inkább a vasredukálókéhoz van közel (Sung és mtsai 2006, He és mtsai 2003).

Elektron donorok adagolásával lehetőség nyílik a mikrobák által végzett degradációs folyamatok felgyorsítására, mivel a redukzív rendszerekben a PCE – amely többszörösen oxidált szennyezőanyag – elektron akceptorként szerepel. Ezért a megfelelő elektron donor kiválasztása az egyik legfontosabb paramétere az egészséges deklorináló mikroorganizmus populáció serkentésének. Kutatási eredmények alapján a molekuláris hidrogén kiemelt szerepet játszik a klórozott alifás szénhidrogének redukzív deklorinációjában. A legtöbb ismert deklorináló szervezet a molekuláris hidrogént elektron donorként használja, néhány

közülük kizárólag ezt képes használni. Mivel az összetettebb elektron donorokat (pl. melasz, laktát) a mikrobaközösség más tagjai anyagcseréjük során folyamatos hidrogén utánpótlás mellett bontják, ezen vegyületek is alkalmazhatók a reduktív deklorináció támogatására (Kao és mtsai 2003, Sung és mtsai 2003).

A lebontó közösség számára hozzáférhető hidrogén mennyiségét és arányát megfelelő körültekintéssel kell megállapítani, minimálisra csökkentve a hidrogén kompetíciót más mikroba csoportokkal, mint pl. metanogének és szulfátredukálók. Ugyanis a metanogénnel történő hidrogénért folytatott versengés okán a deklorináció leállhat laboratóriumi körülmények között (Morse és mtsai 1998). A lassan degradálódó, metanogének számára nem felvehető szubsztrátok alkalmazása segíthet kivédeni az effajta hibákat.

4.6. A dehalogenációban résztvevő mikrobák

A baktériumok reduktív deklorinációja fontos szerepet játszik a klórozott aromás és alifás szénhidrogének eltávolításában a szennyezett területeken (Hendrickson és mtsai 2002, Lendvay és mtsai 2003). Számos baktérium törzset izoláltak, amelyek képesek a PCE és a TCE részleges bontásából energiát nyerni (1. táblázat), például: *Desulfitobacterium dehalogenans*, *Desulfomonile tiedjei*, *Dehalobacter restrictus*, *Sulfurospirillum* sp., *Geobacter lovleyi*, stb. (Utkin és mtsai 1994, DeWeerd és mtsai 1990, Holliger és mtsai 1998, Sung és mtsai 2006), de a kármentesítés teljes, eténig történő lebontást követel (Löffler és mtsai 2000, Smidt és de Vos 2004).

Ez idáig a „*Dehalococcoides ethenogenes* 195” törzs volt az első és egyetlen baktérium törzs, amely képes a PCE eténig történő teljes bontására (Maymo-Gatell és mtsai 1999). Mindazonáltal, csak az első három lépés (PCE→TCE→c-DCE→VC) energiaszerző, a VC bontása eténig lassú, kometabolikus reakció (He és mtsai 2005, Tas és mtsai 2009). A csoport taxonómiai revíziója során a „*Dehalococcoides ethenogenes* 195” törzset az újonnan leírt *D. mccartyi* fajhoz

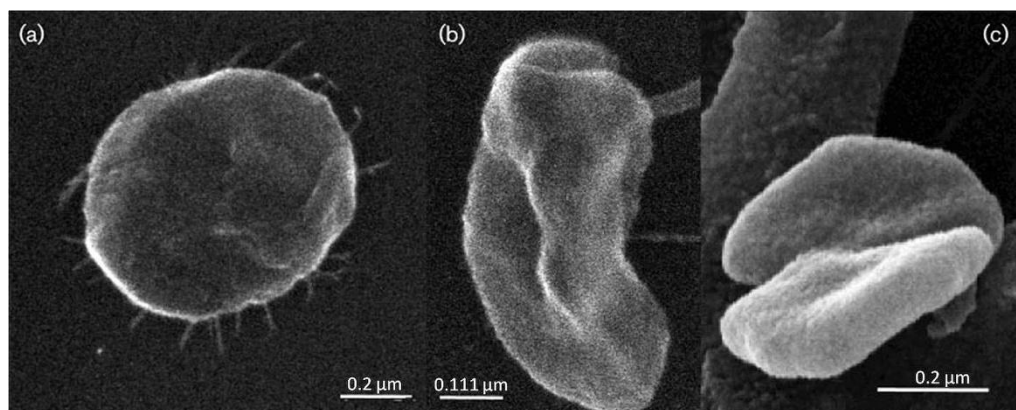
sorolták be a BAV1, CBDB1, FL2, GT és VS törzsekkel együtt (Löffler és mtsai 2013).

1. táblázat. PCE, TCE bontására képes baktériumok (a felsorolás nem teljes). (Holliger és mtsai [1999] alapján.)

Filogenetikai csoport/Fajok	Electron akceptor	Electron donor	Deklorinációs lépések
Firmicutes			
<i>Desulfotobacterium frappieri</i> TCE1	PCE, TCE	butirát, laktát, H ₂	PCE → c-DCE TCE → c-DCE
<i>Desulfotobacterium</i> sp. PCE1	PCE, 2-klórfehol, 2,4,6-triklórfehol, 3-Cl-4-OH-fenilacetát	formiát, piruvát	PCE → TCE
<i>Desulfotobacterium</i> sp. PCE-S	PCE, TCE, 2,4,5-triklórfehol, pentaklórfehol	piruvát	PCE → c-DCE TCE → c-DCE
<i>Dehalobacter restrictus</i>	PCE, TCE	H ₂	PCE → c-DCE TCE → c-DCE
δ-Proteobacteria			
<i>Desulfomonile tiedjei</i>	PCE, TCE, 3-klórbenzoát, pentaklórfehol	H ₂ , formiát, piruvát	PCE → c-DCE TCE → c-DCE
<i>Desulfuromonas chloroethenica</i>	PCE, TCE	piruvát, acetát	PCE → c-DCE TCE → c-DCE
ε-Proteobacteria			
<i>Sulfurospirillum multivorans</i>	PCE, TCE	H ₂ , formiát	PCE → c-DCE TCE → c-DCE
<i>Sulfurospirillum halorespirans</i>	PCE, TCE	H ₂ , formiát, piruvát	PCE → c-DCE TCE → c-DCE
γ-Proteobacteria			
<i>Enterobacter</i> strain MS-1	PCE, TCE	formiát, piruvát, acetát	PCE → c-DCE TCE → c-DCE
Chloroflexi			
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> 195 ^T	PCE, TCE, DCE, VC, klóretánok, klórbenzének	H ₂	PCE, TCE, DCE → etén, VC → etén (kometabolizmus)
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> BAV1	DCE, VC	H ₂	DCE → etén VC → etén
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> GT	TCE, DCE, VC	H ₂	TCE, c-DCE, VC → etén
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> FL2	TCE, DCE, VC	H ₂	TCE, DCE → etén VC → etén (kometabolizmus)
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> CBDB1	PCE, klórbenzének, klórfeholok	H ₂	PCE → t-DCE (kometabolizmus)
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> VS	DCE, VC	H ₂	DCE, VC → etén

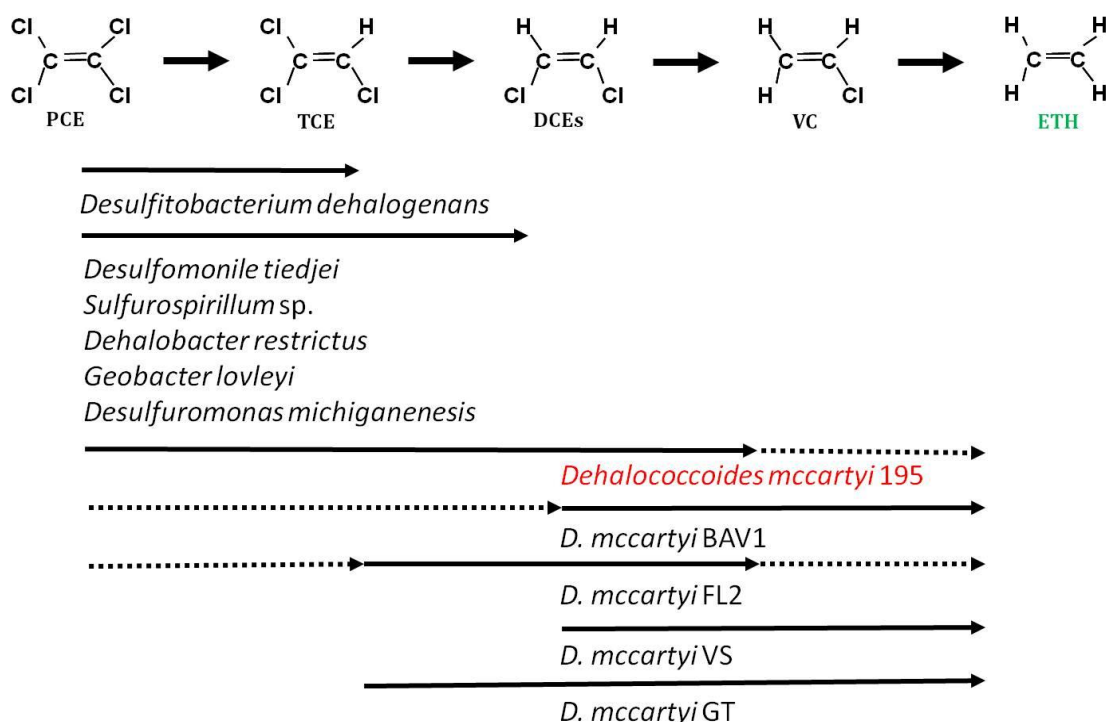
A *D. mccartyi* fajra jellemző, hogy sejtjei nem motilisek, korong alakúak, 0,3-1 µm átmérőjűek és 0,1-0,2 µm vastagok (3. ábra). Növekedéséhez teljesen szintetikus tápközegben halogénezett szerves elektron akceptorokat, hidrogént, mint elektron donort, szén-forrásként acetátot és vitaminokat (B₁₂-t nagy koncentrációban) igényel. Deklorinációs aktivitást figyelték meg *D. mccartyi* törzsek esetében pH 6,5 és 8.0 között, illetve 15°C és 35°C hőmérséklet

tartományban. A hat törzs (195^T, BAV1, CDBD1, FL2, GT és VS) 16S rRNS génjének bázissorrendje nagy, több mint 98%-os hasonlóságot mutat. Filogenetikai elemzések alapján a Chloroflexi csoportba tartoznak. A típustörzs a *D. mccartyi* 195^T (azonosító száma: CP000027), amelyet Ithaca-ban (NY, USA) egy szennyvíziszappal táplált anaerob reaktorból izoláltak (Maymo-Gatell és mtsai 1997). Hendrickson és mtsai (2002) a *Dehalococcoides* nemzetséget három filogenetikai alcsoportra osztották fel a 16S rRNS gén V2 és V6 hipervariábilis régióiban megjelenő bázissorrend különbségek alapján. A Cornell alcsoportba a *D. mccartyi* 195^T, a Victoria alcsoportba a *D. mccartyi* VS, míg a Pinellas alcsoportba a *D. mccartyi* BAV1, CDBD1, FL2 és GT tartoznak.



3. ábra. *Dehalococcoides mccartyi* törzsek elektron mikroszkópos képe. a), b) *D. mccartyi* BAV1, c) *D. mccartyi* CBDB1 (Forrás: Löffler és mtsai 2013).

Mindamellet, nem minden *Dehalococcoides* törzs képes a PCE vagy a TCE teljes deklorinációjára (Maymo-Gatell és mtsai 1997, Hendrickson és mtsai 2002, Duhamel és mtsai 2004, Krajmalnik-Brown és mtsai 2004, He és mtsai 2005, Adrian és mtsai 2007, 4. ábra).



4. ábra: A klórozott etének bontásában résztvevő mikrobák (Futagami és mtsai 2008 alapján).

Egy sor anaerob deklorináló *Dehalococcoides* sp. törzset izoláltak már és reduktív dehalogénáz (RDáz) génjeiket is azonosították. Terepi alkalmazás során a kulcs szervezetek és katabolikus génjeik (melyek a reduktív deklorinációt katalizálják – RDáz) azonosítása és jellemzése elengedhetetlen ahhoz, hogy megbecsülhessük fontosságukat, bontási képességüket és a közösségi anyagcserében betöltött szerepüket. Számos tanulmány, amely a 16S rRNS gén vizsgálatokat célozta, írta le, hogy a *Dehalococcoides* sp. világszerte „bennszülött” számos klórozott eténnel szennyezett területen (Major és mtsai 2002, Lendvay és mtsai 2003, Löffler és Edwards 2006, Tas és mtsai 2009) és jelenléte gyakran összefügg az *in situ* etén felszabadulással (többszörösen klórozott eténekből) (He és mtsai 2003, 2005, Hendrickson és mtsai 2002). Azonban a *Dehalococcoides* 16S rRNS jelenléte és diverzitása nem tükrözi a tényleges deklorinációs potenciált, mivel a 16S rRNS génben egyező törzsek nagy diverzitást mutatnak RDáz gén összetételükben (Duhamel és mtsai 2004, Lovley 2003). Mindeztidáig csak keveset tudunk a RDáz gének diverzitásáról terepi körülmények között vagy a *Dehalococcoides* és RDáz génjeinek változásáról

szelektív nyomás alatt, amit például laboratóriumban dúsítási kísérlet során lehet elemezni.

4.7. Reduktív dehalogenázok

A reduktív dehalogenáz enzimek a reduktív deklorináció során egy klór atomnak egy klórozott etén molekulából történő kihasítását katalizálják (*Smidt és de Vos 2004, Habash és mtsai 2004*). Számos, a klórozott etének, fenolok vagy benzolok deklorinációjában részt vevő RDáz gént izoláltak különböző szervezetekből, amelyek ezeket a klórozott vegyületeket hasznosítják növekedésükhöz (*Magnuson és mtsai 2000, Miller és mtsai 1998, Van de Pas és mtsai 1999*). Azonban, a kis biomassza képzés miatt, a katalitikusan aktív dehalogenázok izolálása *Dehalococcoides* szervezetekből igen nehézkes.

Az elsőként izolált reduktív dehalogenáz a *Desulfomonile tiedjei* DCB-1 törzsből izolált 3-klórbenzoát reduktív dehalogenáz volt (*Ni és mtsai 1995*). Az első reduktív dehalogenázokat kódoló gén szekvenciákat (tisztított enzimekből származó) aminosav szekvenciákon alapuló vizsgálatokkal azonosították. A reduktív dehalogenáz gének (vagy reduktív dehalogenáz homológ gének [*rdh*]) jellemzően egy *rdhA*-ból, ami az aktív enzim génje, egy *rdhB*-ből, ami a membránköti fehérjét kódoló gén és néhány esetben *rdhTKZECD* tagjaiból, amelyek a reduktív dehalogenázokhoz kapcsolódó gének, állnak (*Smidt és mtsai 2000*).

Az *rdh* gének homológ elnevezése a specifikus konzervált motívumokon alapul. *RdhA* fehérjék számos konzervált sajátossággal rendelkeznek, többek között két Fe-S klaszterköti motívummal és egy iker arginin szignál motívummal. Több, ha nem az összes, leírt *RdhA* tartalmaz korrinoid kofaktorokat (B₁₂ származékok). A korrinoid kofaktor fontosságát bizonyítja, hogy hiányában a *Sulfurospirillum multivorans* és a *Dehalobacter restrictus* PER-K23 törzsek elvesztették PCE deklorinációs képességüket (*Maillard és mtsai 2003, Siebert és mtsai 2002*).

Habár számos *rdhA* gént azonosítottak a tisztított enzim részleges aminosav szekvenciája alapján, az RdhA fehérjék három-dimenziós szerkezetét még nem határozták meg és az aktív centrumukat sem azonosították. A legtöbb *rdhA* gént szekvencia hasonlóság alapján azonosították, illetve a korábban leírt specifikus motívumok alapján. Az nem bizonyos, hogy az összes RdhA fehérje homológ.

Reduktív dehalogenáz kódoló géneket azonosítottak egy sor szigorúan anaerob baktériumban: *Sulfurospirillum* (Neumann és mtsai 1994), *Desulfitobacterium* (Miller és mtsai 1998), *Dehalobacter* (Holliger és mtsai 1998) és *Dehalococcoides* (Kube és mtsai 2005). Ez idáig egyetlen Archaea reduktív dehalogenáz gént azonosítottak egy *Ferroglobus* szervezetből (Hafenbradl és mtsai 1996).

Az új reduktív dehalogenáz géneket eleinte PCR-alapú vizsgálatok, később genom illetve metagenom bázissorrend meghatározási elemzések során írták le, minden újabb és újabb szervezet, illetve környezet mintázásával növelve az *rdhA* gének diverzitását. A *Desulfitobacterium*, *Dehalococcoides*, *Dehalogenimonas* és *Dehalobacter* szervezetek genomja többszörös *rdhA* géneket tartalmaz.

A *tceA* gén, amely a triklóretén (TCE) RDáz enzimet kódolja, megtalálható a *D. mccartyi* 195 és FL2 törzsek genomjában. Ezek a törzsek képesek a TCE-t VC-ig metabolikusan, míg a VC-t eténig kometabolikusan bontani (He és mtsai 2005, Tas és mtsai 2009). A *D. mccartyi* VS és GT törzsek is képesek a klórozott etének bontására, a reakció során a *vcrA* gén expresszálódik, ami a VC RDáz enzimet kódolja (Müller és mtsai 2004, Sung és mtsai 2006). A *D. mccartyi* BAV1 törzsben a *bvcA* gén szintén egy VC RDáz enzimet kódol (Krajmalnik-Brown és mtsai 2004), ami a VC deklorinációjában vesz részt (He és mtsai 2005).

Dehalococcoides által történő deklorinációt figyelték meg laboratóriumi kísérletek során (Fennell és mtsai 2001, Révész és mtsai 2006, Nijenhuis és mtsai

2007), reaktorokban (*Chung és mtsai 2008*) és dúsító kultúrákban (*Holmes és mtsai 2006, Lee és mtsai 2006, 2008, Cichocka és mtsai 2010*). Számos tudományos cikkben bemutatásra került, hogy több különböző elektron donor képes a TCE eténig történő redukív dehalogenációjának serkentésére, azonban minden esetben a valódi elektron donor a hidrogén és ezért a komplex elektron donoroknak is hidrogénné kell alakulniuk fermentációs útvonalakon keresztül (*Maymo-Gatell és mtsai 1995*). Napjainkban a biostimulációs módszerek a hidrogén-használó deklorináló szervezetek serkentésére (főként *Dehalococcoides* szervezetek) koncentrálnak (*He és mtsai 2002*), habár ezen szervezeteknek még más mikrobákkal (pl. metanogének, acetogének és szulfát-redukáló baktériumok) is versenyezniük kell a hidrogénért.

4.8. Abiotikus redukív deklorináció

A klórozott szénhidrogének bomlása történhet abiotikus úton is, nagyon erős redukálószer (nulla, illetve +2 vegyértékű vas, szulfid vagy redukált B₁₂ vitamin) jelenlétében. Amikor elég erős redukálószer van jelen, a többszörösen klórozott vegyületek biotikus folyamatok nélkül degradálódnak. Az abiotikus és a biotikus redukív deklorináció különböző kémiai útvonalon megy végbe: redukív β -elimináció (abiotikus) és hidrogenolízis (biotikus), különböző bomlástermékeket eredményezve (abiotikus úton PCE és TCE bomlásából acetilén keletkezik). Ha a reaktív vegyületek és mikroorganizmusok is jelen vannak egy szennyezett területen, akkor mind az abiotikus, mind a biotikus redukív deklorináció végbemehet egyidejűleg. A bomlástermékek nyomon követésével megállapítható, hogy abiotikus vagy biotikus degradáció megy végbe egy adott területen (*US EPA 2002*).

4.9. Rövidszénláncú alifás klórozott szénhidrogének bontásában résztvevő mikrobaközösségeket vizsgáló molekuláris módszerek

A tenyésztési vizsgálatok elengedhetetlenül fontosak a mikrobiális ökológiában, de szelektivitásuknak köszönhetően rendkívüli torzító hatással bírnak a mikrobiális genetikai diverzitás-bebecslésre. A genetikai és a bázissorrend meghatározási módszerek fejlődésével a tenyésztéstől független vizsgálatok egyre inkább tért nyertek a mikrobiális ökológiában. Környezeti minták molekuláris közösség vizsgálatai bizonyították, hogy a prokarióta fajok <1%-a vonható tenyésztésbe. Nukleinsavak, fehérjék és zsírsavak kivonásán és elemzésén alapuló molekuláris technikákat fedeztek fel, amelyek új, értékes információval szolgáltak a mikrobiális közösségek szerkezeti és funkcionális diverzitásáról. A molekuláris megközelítés, beleértve a genetikai ujjlenyomat módszereket is, elengedhetetlen a hatalmas mikrobiális diverzitás felderítésében és karakterizálásban, illetve annak megértésében, hogy az egyes mikroba közösségek hogyan reagálnak a biotikus és az abiotikus környezeti változókra.

A molekuláris ujjlenyomat („fingerprinting”) módszerek közé tartoznak polimeráz láncreakción (PCR) alapuló technikák is, amelyek a közösségi RNS (cDNS) vagy DNS minták különböző fizikai szeparációs elven alapuló, gyors és hatékony elemzésére alkalmasak. Az amplikonok elválasztása mindegyik ujjlenyomat módszer esetén egy speciális, csak az adott mikrobaközösségre jellemző mintázatot eredményez. Az ujjlenyomat módszerek ezáltal lehetővé teszik:

- ✓ több minta egyidejű, gyors vizsgálatát
- ✓ a különböző mikroba közösségek genetikai diverzitásának összehasonlítását
- ✓ egy adott közösség időbeli változásának monitorozását, pl. szezonális dinamika követését (tavasz-nyár-ősz-tél)
- ✓ adott környezeti tényezők mentén változó közösségek vizsgálatát (pl. talaj mélység, redox potenciál).

A környezeti minták 16S rDNS gén alapú PCR vizsgálatai széles körben elterjedtek a mikrobiális ökológiában, mivel ezek a gének minden prokariótában megtalálhatók, szerkezetileg és funkcionálisan is konzerváltak, variábilis és erősen konzervált régiókat egyaránt tartalmaznak (*Hugenholtz 2002*). Emelett, a megfelelő gén méret (~1500 bp) és az összehasonlítható, adatbázisban található 16S rDNS szekvenciák növekvő száma is megfelelővé teszi a gént mikrobiális ökológiai, illetve ujjlenyomat vizsgálatokra.

4.9.1. ARDRA – amplifikált riboszómális DNS restrikciós analízise

Az ARDRA során az amplifikált 16S rDNS-t emésztjük többféle restrikciós endonukleázzal és a kapott fragmenteket agaróz gélelektroforézissel választjuk el egymástól (*Vanechoutte és mtsai 1992*). Környezeti minták esetén az egyes fajoknál a restrikciós hasítási helyek száma és elhelyezkedése nem egyforma, így a kapott sávmintázat az eltérő fragmentumszám és méret miatt különbözik. A szeparáció eredménye a közösségre jellemző hasítási mintázat.

4.9.2. DGGE – denaturáló gradiens gélelektroforézis

A denaturáló gradiens gélelektroforézis egy olyan PCR-alapú ujjlenyomat módszer, amellyel azonos hosszúságú, de különböző bázisösszetételű DNS darabok választhatók el egymástól. Segítségével összehasonlíthatóak baktérium közösségek, illetve monitorozhatóak baktérium közösségek diverzitásában bekövetkező változások. Az elektroforézist poliakrilamid gélben végezzük. Az elválasztás a részlegesen „megolvadt” DNS molekula elektroforetikus mobilitásán alapul. A DNS darabok az úgynevezett egyedi „olvadási doméneknek” megfelelően olvadnak meg. Ezen domének bázisösszetételének különbözősége okozza a különböző olvadáspontokat. Amikor a legalacsonyabb olvadáspontú „olvadási domén” eléri azt a denaturáló koncentrációt, ahol ez a domén megolvad, a molekula térszerkezete megváltozik (már nem tökéletes kettős spirál), így mobilitása a gélben annyira lecsökken, hogy mozdulatlan lesz, s ez a gélben egy jól elkülönült sávként

detektálható. A többi, eltérő szekvenciájú fragmentum később, a gél más pontjain fog megállni. A baktérium közösségek diverzitásbeli különbsége láthatóvá válik sávmintázatuk alapján.

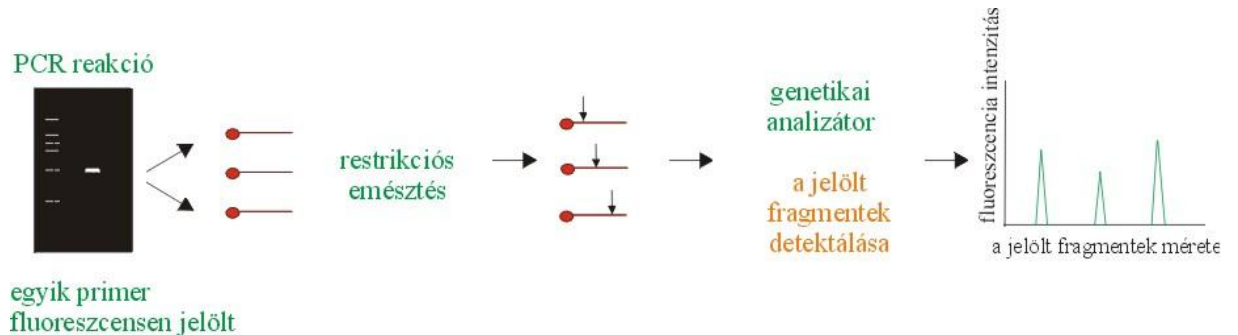
A PCR során speciális primereket használnak. Az egyik primer végéhez GC-toldalékot („GC-clamp”) ragasztanak, ami egy 30-50 bázispár hosszúságú guanin és citozin bázisokban gazdag szekvencia. Ez a GC-toldalék nagyon magas olvadáspontja révén nem engedi, hogy a vizsgált DNS fragmentum két szála esetleg teljesen megolvadva elváljon egymástól (*Muyzer és mtsai 1993*).

Egy biostimulációs eljárás során, DGGE módszerrel nyomon követhető a bakteriális közösség diverzitás változása az adalékanyag hatására. *Iwamoto és mtsai (2000)* metán adagolás TCE bontó baktérium közösség diverzitására gyakorolt hatását vizsgálták egy terepi biostimulációs kísérletben. Azt tapasztalták, hogy a szubsztrát adagolás után megváltozott a bakteriális közösség diverzitása és egészen addig ingadozott a TCE bontás hatékonysága, amíg egy diverz, stabil bakteriális közösség ki nem alakult.

4.9.3. T-RFLP – terminális restrikciós fragmenthossz polimorfizmus

Ezen ujjenyomat technika alkalmazása során olyan PCR reakciót végzünk, amelyben az egyik primer 5' végén fluoreszcens festékkel jelölt. Az amplifikáció után a PCR terméket egy vagy több restrikciós enzimmel emésztjük és így különböző hosszúságú terminálisan jelölt fragmenteket (T-RF) kapunk a DNS szekvenciától és az enzim specifitásától függően (*Moeseneder és mtsai 1999*). Az emésztett ampikonok elválasztása nagy hatékonyságú (pl. kapilláris) elektroforézissel történik, viszont csak a fluoreszcensen jelölt terminális fragmentumokat detektáljuk lézerrel (5. ábra). A mintákkal együtt futtatunk egy eltérő fluoreszcens jelöléssel ellátott belső molekulaszenderdet, így lehetővé válik a pontos fragmentumhossz meghatározása. A vizsgált mintáknál a primerek kötési illetve a restrikciós enzimek hasítási helyeinek ismeretében adott fajokhoz, törzsekhez terminális

fragmentumhosszak adhatóak meg. Ezáltal különböző minták terminális fragmentum-hosszaihoz filogenetikai információ rendelhető, a görbe alatti területekből pedig a mennyiségi viszonyokra következtethetünk.



5. ábra: A T-RFLP technika sematikus vázlata.

Elméletben minden T-RF egyetlen taxonómiai egységet (OTU – Operational Taxonomic Unit) reprezentál. A bioinformatika fejlődésével számos internetes T-RFLP elemző program került kifejlesztésre, ami lehetővé teszi a T-RF-ek gyors azonosítását ismert 16S rDNS szekvenciákkal.

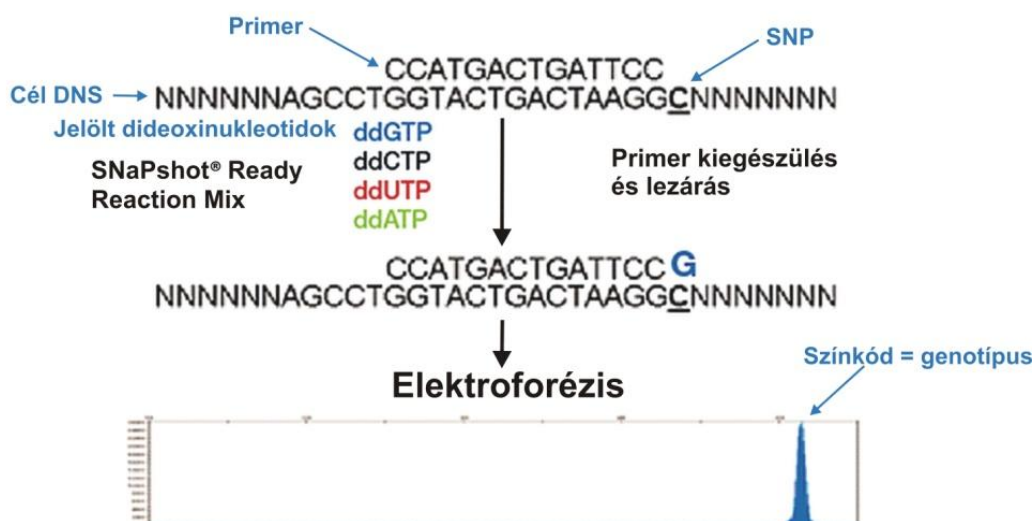
Egy összehasonlító vizsgálatban (Moesender és mtsai 1999), melynek során tengeri baktériumközösségeket elemeztek, megállapították, hogy T-RFLP módszerrel nagyobb felbontás (több OTU) érhető el, mint DGGE-vel.

4.9.4. SNuPE – Single-nucleotidePrimer Extension módszer

Napjainkban, számos olyan technika vált molekuláris kimutatási illetve „ujjlenyomat” módszerré a mikrobiális közösség szerkezeti vizsgálatokban, amit eredetileg pontmutációk kimutatására hoztak létre (pl. DGGE – denaturáló gradiens gélelektroforézis, SSCP – egyszálú konformációs polimorfizmus). A SNuPE módszert eredendően különböző génekben található nukleotid polimorfizmusok azonosítására fejlesztették ki (Piggee és mtsai 1997, Nikolausz és mtsai 2009) és egyszerűségének köszönhetően vált nagyon népszerűvé örökletes betegségek diagnosztikájában (Kuppuswamy és mtsai 1991), prenatális vizsgálatokban (Syvänen 2001), apasági tesztekben (Wang és mtsai 2006),

törvényszéki kutatásokban (Sobrinho és mtsai 2005), és különböző szervezetek szekvencia alapú azonosításában (Ferri és mtsai 2010).

A módszer a DNS polimeráz enzim nagy pontosságát használja ki a dideoxinukleotid-trifoszfát (ddNTP) beépítésénél, ami a szekvencia variánsok nagyon specifikus megkülönböztetését eredményezi. Elvben, a primer hosszabbítás nemcsak bizonyos nukleotid pozíciók meghatározására alkalmas, de segítségével hibridizációs esemény azonosítása is lehetséges. Az AmpliTaq FS polimeráz beépíti a jelölt ddNTP-t, ami a szabad OH-csoportok hiánya miatt leállítja a reakciót és egy fluoreszcensen jelölt, kiegészült primert eredményez (6. ábra).



6. ábra: A SNaPE reakció elve (forrás: Life Technologies).

A különböző ddNTP-k különböző fluoreszcens jelöléssel bírnak és ezáltal a fluoreszcencia típusa („színkód”) információt szolgáltat a beépült, illetve az ellenkező szálon lévő kérdéses nukleotidról is. A nukleotid taxonómiai információt is szolgáltatathat és a fluoreszcens szignált szemikvantitatív módon fel lehet használni, amint a szignál intenzitás és a templát abundancia között lévő összefüggést megállapítjuk.

Egyszerre több primert is lehet alkalmazni ebben a módszerben (*multiplex SNUPE*), ilyenkor a különböző primerek hosszukban is különböznek egymástól a primer 5' végén található nem komplementer „farok” (poli T) következtében. A primereket és a termékeket végül kapilláris elektroforézissel választjuk el egymástól, de kizárólag a meghosszabbodott termékeket detektáljuk lézerindukált fluoreszcenciával.

Először Sokolov (1990) bizonyította a „primer hosszabbodás” alkalmazhatóságát nukleotid polimorfizmusok meghatározásában genomiális DNS felhasználásával. Ebben a tanulmányban, négy párhuzamos ciklikus reakciót végeztek, radioizotóp-jelölésű nukleotidokat használva, a szeparációt pedig gél-elektroforézissel végezték. Később, a radioizotóp-jelölést (Kuppuswamy és mtsai 1991) fokozatosan felváltották a fluoreszcens technikák (Pastinen és mtsai 1996), és a gél-elektroforézissel történő elválasztást (Krook és mtsai 1992) a kapilláris elektroforézis (Tully és mtsai 1996, Mátyás és mtsai 2002). A radioizotóp-jelöléses próbák nagyon pontosak és érzékenyek voltak ugyan, de a homogén jelölés eleve kizárta a multiplex detektálás lehetőségét. Olyan ddNTP-ket alkalmazva, amelyek mind különböző fluoreszcens festékkel voltak jelölve, lehetővé vált ezeknek a bázis variánsoknak az egyetlen reakcióban történő detektálása (Piggee és mtsai 1997).

A módszer első mikrobiológiai alkalmazhatóságát Rudi és munkatársai (1998) bizonyították. Toxikus cianobaktériumok detektálására fejlesztették ki „primer hosszabbodás” alapú technikájukat, egyetlen beépülő ddNTP-t jelölve. Egy ddNTP jelölést alkalmazva leszűkül a primer tervezési lehetőség bizonyos szekvencia pozíciókra, és a beépülő végi nukleotid nem nyújt további taxonómiai információt. Nikolausz és mtsai (2008) alkották meg az első multiplex próbát *Dehalococcoides* spp. szekvenciák detektálására és tipizálására. A *Dehalococcoides* nemzetség három alcsoportjának (Cornell, Victoria és Pinellas) elkülönítését célozták meg és később az általuk készített próbákkal szennyezett talajvíz mintákat monitoroztak. Egy továbbfejlesztett SNUPE módszert dolgozott ki Wu és Liu (2007) különböző taxonómiai szintekre specifikus

primereket használva. A módszert – HOPE (Hierarchial Oligonucleotide Primer Extension) – sikeresen alkalmazták *Bacteriodes* spp. relatív abundanciájának meghatározására szennyvíz és ürülék mintákban. Táncsics (2009) BTEX (benzol, toluol, etilbenzol és a xilolok)-bontó *Rhodococcus* fajok kimutatását és tipizálását végezte el a filogenetikai információt is hordozó *catA* gén-alapú SNuPE módszerrel. Az első környezeti mintákra alkalmazott mRNS-alapú funkciógén specifikus SNuPE módszer szintén Táncsics és munkatársai (2013) nevéhez fűződik. BTEX vegyületekkel szennyezett talajvizek monitorozása során az 1.2.C extradiol dioxigenáz gén expressziójának változását vetették össze a mikrobiális közösség szerkezetének változásával (16S-alapú T-RFLP vizsgálatok) egy 13 hónapon át tartó vizsgálat során. Ennek eredményeképpen a lebontás szempontjából fontos funkciót filogenetikai információhoz tudták rendelni.

4.9.5. Real-time qPCR – valós idejű kvantitatív PCR

A 16S rRNS gént illetve katabolikus géneket célzó analitikai vizsgálatok igen elterjedtek a mikrobiális kvantifikálásban. Ezek többek között hibridizáción alapuló technikák illetve PCR-alapú módszerek. A PCR-alapú módszerekkel kis koncentrációban jelen lévő DNS/RNS is detektálható.

A real-time qPCR módszer a valós időben amplifikálódó PCR termék mennyiségét követi nyomon. Az amplifikációs ciklusok során változó PCR termék koncentrációjából meghatározható a kiindulási DNS/RNS koncentráció. qPCR folyamán az amplikon koncentrációját követjük nyomon az amplifikációs ciklusok során fluoreszcens reagenseket alkalmazva. Ezek a reagensek az amplikonhoz kötődnek anélkül, hogy leállítanák az amplifikációs reakciót. Az eljárás során emittálódó fluoreszcencia intenzitás az amplikon koncentrációjára utal.

Számos *Dehalococcoides* szervezeteket célzó kvantitatív PCR próbát fejlesztettek. A kezdeti qPCR módszerek a 16S rRNS gént célozták meg (He és mtsai 2003), de mivel a különböző *Dehalococcoides* törzsek nagyon hasonló 16S

rRNS gén bázissorrenddel rendelkeznek, azonban különböző dehalogenációs aktivitásra képesek, később a redukív dehalogenáz gének váltak a vizsgálatok célpontjává.

A *Dehalococcoides* szervezetek fenntartása tiszta tenyészetekben igen nehézkes. Növekedésükhöz B₁₂ vitamint igényelnek nagy koncentrációban. Ahhoz, hogy a fenntartási körülményeket optimalizálni tudják, egy kísérlet során qPCR módszert alkalmaztak a *D. mccartyi* 195 törzs növekedését vizsgálva különböző laboratóriumi körülmények között (He és mtsai 2007). A vizsgálat alapján képesek voltak a *D. mccartyi* 195 törzs növekedéséhez szükséges feltételek leírására. Ezen túl azt is megállapították, hogy a B₁₂ vitamin koncentrációját 0,001 mg/l-ről 0,025 mg/l-re növelve duplájára emelkedett a sejtsűrűség. A szerzők vizsgálták más mikroorganizmusok *D. mccartyi* 195 törzs növekedésére gyakorolt hatását is. Kvantitatív PCR-t alkalmazva azt tapasztalták, hogy a *D. mccartyi* 195 törzs sejtszáma másfélszeresére emelkedett azokban a tenyészetekben, amelyek *Desulfovibrio desulfuricans* és/vagy *Acetobacterium woodii* szervezetek is tartalmaztak. Megállapították, hogy a hozzáadott mikroorganizmusok sokkal kedvezőbb növekedési körülményeket teremtettek a laktát fermentációja által (He és mtsai 2007).

Kvantitatív PCR módszert fejlesztettek dehalogenáz gének vizsgálatára tiszta tenyészetekben, mikrokozmoszokban és környezeti mintákban (Ritalahti és mtsai 2006). A tiszta tenyészetek vizsgálatakor azt tapasztalták, hogy a 16S rRNS gén és a katabolikus gének kópiaszáma hasonló volt, jelezve, hogy a katabolikus gének egyszeres kópiaszámú génként vannak jelen a *Dehalococcoides* genomban. Ehhez hasonlóan, ismert *Dehalococcoides* törzseket tartalmazó környezeti mintákban a három (*tceA*, *vcrA*, *bvcA*) katabolikus gén kópiaszáma összesen egyenlő volt a *Dehalococcoides* kópiaszámmal. Ezzel szemben, talajvízmintákban és mikrokozmoszokban a három katabolikus gén kópiaszáma sokkal kevesebbnek mutatkozott a becsült összes *Dehalococcoides* kópiaszámnál, utalva ezzel arra, hogy a *Dehalococcoides* szervezetek valószínűsíthetően egyéb redukív dehalogenázokat tartalmaztak, amelyeket

nem tudtak az általuk alkalmazott qPCR próbákkal kimutatni (*Ritalahti és mtsai 2006*).

4.9.6. FISH – fluoreszcens *in situ* hibridizáció

A FISH lehetővé teszi mikrobiális közösségek mennyiségi és minőségi meghatározását természetes környezetükben, illetve katabolikus génjeik vizsgálatát. A módszer elve, hogy a sejteket fixálják, fluorescens festékekkel jelölt DNS specifikus próbákkal hibridizálják, majd mikroszkóposan vizsgálják. A módszer előnye, hogy általa lehetőségünk van tenyésztésbe nem vont mikroorganizmusok karakterizálására (információhoz jutunk ugyanis a sejtek morfológiájáról, számáról, elhelyezkedéséről is). A FISH egyben olyan taxonómiai módszer is, amelynek során legtöbbször egy specifikus filogenetikai csoport jelenlétét akarjuk meghatározni. Egyszerre akár több, különböző fluoreszcens festékekkel jelölt próba is hibridizáltatható, így több különböző filogenetikai csoport egyidejűleg vizsgálható (pl. Archaea vs. Bacteria).

Sok esetben alkalmazzák TCE bioremediációs vizsgálatokban a FISH módszert *Dehalococcoides* szervezetek kimutatására és kombinálják más molekuláris illetve kinetikai vizsgálatokkal. *Aulenta és mtsai (2004)* laboratóriumi bioreaktorok vizsgálata során végeztek mennyiségi és minőségi *Dehalococcoides* kimutatást FISH módszerrel. Amikor bizonyossá vált a *Dehalococcoides* szervezetek jelenléte, kinetikai vizsgálatokat végeztek a maximális deklorinációs aktivitás megállapítására. FISH módszerrel megállapított relatív abundancia összhangban volt a kinetikai vizsgálatok során megállapított értékkel. Klónkönyvtár és T-RFLP elemzést is kombináltak FISH vizsgálattal TCE degradáció során mikroorganizmusok kimutatására illetve populáció dinamikai változások nyomonkövetésére (*Richardson és mtsai 2002*). FISH vizsgálatra a PCR módszerből eredő hibák kiküszöbölésére volt szükség. Ezzel a módszerrel olyan mikroorganizmusok fontosságára is fény derült, amelyek a klónkönyvtár vizsgálatokban alulreprezentáltak maradtak.

Ugyanakkor *Dehalocoides*-szerű szervezetek nem mutattak hibridizációt a FISH vizsgálatok során, ugyanakkor a klónkönyvtárakban megjelentek.

4.10. Mikrokozmosz kísérletek

Abbott (1966) a mikrokozmoszt *miniatürizált ökoszisztémaként* definiálta. Megállapította, hogy a természetes rendszerek kiszámíthatatlanságának és komplexitásának köszönhetően az *in situ* kísérletek gyakran bizonytalan és nem meggyőző eredménnyel járnak. Számos kutatócsoport alkalmazott sikeresen mikrokozmosz kísérleteket annak érdekében, hogy ezzel leegyszerűsítse természetes rendszereken végzett kísérleteinek körülményeit. Abbott leírta továbbá, hogy ugyan a mikrokozmoszok nem adják vissza pontosan a természetes rendszereket, lehetővé teszik a kontrollált körülmények között való vizsgálatukat.

Egy mikrokozmosz kísérlet az alábbi kérdésekre adhat választ (*Fennell és Gossett 2003* alapján):

- ✓ képesek-e az őshonos deklorináló baktériumok a szennyező teljes degradálására vagy csupán részlegesen redukált bomlástermékek halmozódnak fel?
- ✓ mely elektron donorok a leghatékonyabbak a teljes bontás stimulálásában?
- ✓ mi az elektron donor fermentációs útja?
- ✓ milyen mennyiségben kell beadagolni az elektron donort?
- ✓ hogyan változik a mikrobiális közösség szerkezete az elektron donor beadagolás hatására illetve a degradáció során?

A halogénezett szénhidrogén-bontó közösség ujlenyomat-mintázatának változását gyakran követik laboratóriumi körülmények között, mikrokozmosz

kísérletek során. A szennyezett területről származó mintákhoz adalékanyagokat adnak, majd különböző időközönként vizsgálják a kémiai és a mikrobiológiai paraméterek változását. Ezzel kis térfogatokban modellezik a területen bekövetkező folyamatokat és következtetnek az egyes kezelések hatékonyságára (Kao és Prosser 1999).

Nijenhuis és mtsai (2007) mikrokozmoszokat állítottak össze szennyezett talajvíz felhasználásával. PCE szolgált elektron akzeptorként, butirátot és laktátot adagoltak elektron donorként, illetve összeállítottak abiotikus (előlt) és biotikus (elektron donor adagolás nélküli) kontrollokat is. Butirát és laktát adagolással száz nap után VC-ig történő degradációt tapasztaltak, majd további 25-50 nap elteltével teljes, eténig történő bomlást. Az adagolás nélküli, biotikus kontrollok vizsgálata rámutatott arra, hogy a területen létrejövő részleges redukatív deklorinációnak számos tápanyag illetve B₁₂ vitamin hiány lehet az oka. A "működő" mikrokozmoszokból mintát vettek és ezzel újabb mikrokozmoszokat oltottak be. Ebben az esetben laktát volt az elektron donor és PCE illetve TCE az elektron akceptor. Ezekben a mikrokozmoszokban is teljes, eténig történő degradációt tapasztaltak, ám érdekes módon, VC felhalmozódás nélkül. Azt a következtetést vonták le, hogy a friss tápközeg, illetve a vitaminok és tápanyagok elérhetősége kedvezett a hatékonyabb deklorinációs folyamatoknak. A kis szennyezőanyag koncentrációjú kutakból származó mintákból összeállított mikrokozmoszok esetében nem figyeltek meg bomlástermékeket. Ezt az őshonos deklorináló baktériumok hiányával magyarázták. A mikrokozmosz kísérletek lehetővé tették a területen zajló biodegradációs folyamatok jobb megismerését.

Egy másik tanulmányban Guerrero-Barajas és mtsai (2011) mikrokozmosz kísérletek során szulfátredukció és triklóretén biodegradáció együttes megvalósulását vizsgálták két különböző hőmérsékleten (37°C és 70°C) hidrotermikus forrásokból származó üledék mintákat alkalmazva. Szubsztrátként volatilis zsírsavak keverékét adagolták. A mikrobiális közösség tagjait 16S rRNS gén alapú klónkönyvtár bázissorrend meghatározásával

azonosították. Azt tapasztalták, hogy - más irodalmi adatokkal szemben - a nagy szulfát koncentráció nem gátolta a deklorinációt, és a TCE bontása 30 napon belül megtörtént a 37°C-on inkubált mikrokozmoszokban. A klónkönyvtár elemzés rámutatott szintróf közösségek jelenlétére, melyekben *Clostridium*, *Bacillus* és *Desulfuromonas* szervezeteket azonosítottak.

Mikrokozmosz kísérletek során lehetőség nyílik bioaugmentációs vizsgálatok elvégzésére is az igen költséges *in situ* beavatkozások előtt. *Friis és mtsai* (2007) mikrokozmoszaikat egy kevert anaerob deklorináló kultúrával (KB-1™) inokulálták 40°C-ról 10°C-ra történő hűtés során tesztelve ezzel a területen alkalmazandó ideális hőmérsékletet a bioaugmentációs beavatkozás során. Elektron donorként laktátot adagoltak. A 30°C-on inokulált mikrokozmoszok gyors és teljes deklorinációt mutattak, ugyanakkor a 40°C-on inokulált mikrokozmoszokban gyors, de csak részleges deklorináció volt megfigyelhető. A 10°C és 20°C-on inokulált mikrokozmoszokban a 150. napig részleges, c-DCE illetve VC-ig történő deklorináció játszódott le, viszont a 300. napra, teljes, eténig végbemenő degradáció történt. Az eredményekből azt a következtetést vonták le, hogy szennyezett területen végzett hőkezelés során szekvenciális termikus és biológiai TCE remediáció lehetséges donor adagolás után illetve, hogy a bioaugmentáció optimális hőmérséklete körülbelül 30°C.

V. Célkitűzések

Munkánk során négyféle különböző vizsgálatot végeztünk a dehalogenáló közösségek részletesebb megismerésére, feltárására.

A halogénezett szénhidrogénnel szennyezett területek Bacteria közösségének diverzitása jól kutatott terület, ám az Archaea közösségről, annak összetételéről, a dehalogenációban betöltött szerepéről máig nem rendelkezünk elegendő információval. Vizsgálatok bizonyították, hogy közreműködnek a halogénezett szénhidrogének kometabolikus bontásában (Löffler és mtsai 1999), ugyanakkor azt is, hogy kompetítorai lehetnek a haloinspiráló baktériumoknak a hidrogénért folytatott „versengés” során (Yang és McCarty 1998). Az első kísérletsorozatban tehát célunk volt többféle kémiai és geológiai paraméterű területről, több különböző mélységből vett talajvízminta Archaea közösségének részletesebb megismerése, diverzitásának vizsgálata molekuláris ujjlenyomat módszerekkel. Ehhez olyan monitorozási eljárásokat kellett kidolgoznunk, amelyek gyorsak, hatékonyak, nagy mintaszámnál is kivitelezhetőek és alkalmasak a diverzitás-különbségek detektálására összefüggésben a kémiai paraméterekkel. Majd az eredményekből következtetni szerettünk volna az Archaea közösség változásának indikátor szerepére a dehalogenáció folyamatában. Célunk volt még egy saját adatbázis létrehozása további felhasználásra is, mivel az Archaea-kra vonatkozó internetes adatbázisok napjainkig nagyon hiányosak. A kémiai eredményekre alapozva egyéb (nem Archaea) mikrobacsoportok jelenlétére is következtetni szerettünk volna, továbbá az alkalmazott *in situ* bioremediációs technikát is értékeltük.

A második vizsgálat sorozatban különböző deklorináló rendszerek (talajvíz, mesterséges láp, mikrokozmosz és dúsító kultúrák) *Dehalococcoides* sp. és RDáz (*tceA*, *bvcA* és *vcrA*) diverzitását vetettük össze. Továbbá a

Dehalococcoides alcsoportok 16S rRNS gén szekvenciáit és a három RDáz (*tceA*, *bvcA* és *vcrA*) gén szekvenciáját bázissorrend elemzésnek vetettük alá és összehasonlítottuk őket az egyes rendszerek között. A rendszereknek ugyanaz a talajvíz volt a forrásuk, ám eltértek az „uralkodó” környezeti feltételekben, a rendszer komplexitásában és heterogenitásában ugyanúgy, mint a deklorinációs aktivitás fokában. Ezek a különbségek okozhatták a *Dehalococcoides* populációk szelektív dúsulását különböző dehalogenáz génekkel, ami aztán hatással lehetett az *in situ* deklorinációs aktivitásra. Ebben a kísérletsorozatban a következő kérdéseket foglalmaztuk meg: 1) a laboratóriumi mikrokozmoszokban dúsított *Dehalococcoides* sp. reprezentálja-e a teljes vizsgált terület *Dehalococcoides* diverzitását; 2) hogyan befolyásolják a környezeti körülmények (pl. kémiai- és geológiai paraméterek), beleértve a dúsítási körülményeket is, a *Dehalococcoides* diverzitást és annak kulcs enzimeit; és 3) a *vcrA* és a *bvcA* gének együttesen társulnak-e a klórozott etének teljes dehalogenációjához?

Igen nehéz előre megjósolni egy szennyezett terület mikrobiális közösségének deklorinációs potenciálját, ha nem ismerjük a biológiai lebontásban résztvevő katabolikus gének elterjedését és funkcióját. Ezért harmadik vizsgálatunkban egy molekuláris módszer fejlesztését tűztük ki célul, amellyel PCR termékekben található specifikus szekvenciák, jelen esetben különböző RDáz gének kimutatását és azonosítását kívántuk megvalósítani. Egy új ujjlenyomat technikát, „single-nucleotideprimer extension” (SNUPE) módszert fejlesztettünk, amelynek segítségével lehetőség nyílt a redukív dehalogenáz gének kimutatására és a lebontási potenciál, illetve aktivitás nyomon követésére szennyezett mintákban.

Negyedik vizsgálatunkban háromfázisú mikrokozmoszokat állítottunk össze talaj, szubsztrátok és nyomelemek adagolásával, mivel korábbi elemzések (Mészáros és mtsai 2011, Sipos és mtsai 2011) a TCE részleges deklorinációját mutatták kétfázisú rendszerekben. Ez feltételezhetően a megfelelő felület, és ezáltal a biofilm képzés képességének hiányával volt magyarázható. Komplex

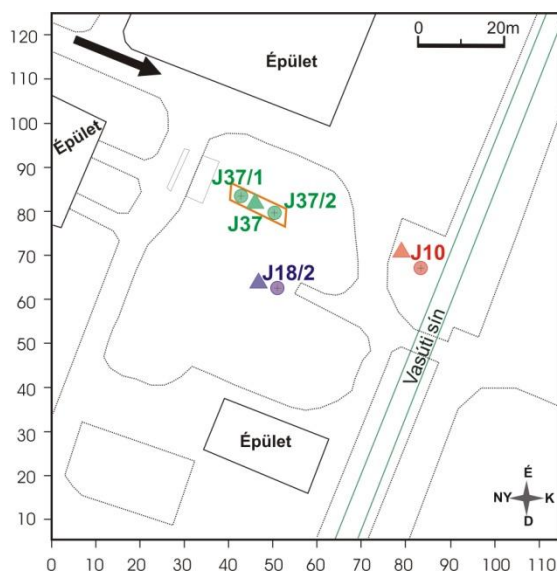
kémiai és molekuláris biológiai megközelítést alkalmaztunk, beleértve mRNS vizsgálatokat és katabolikus gén kimutatásokat a jelenlévő deklorinációs potenciál meghatározására. Molekuláris ujjlenyomat módszerekkel követtük nyomon a bakteriális közösség szerkezetben kialakult változásokat és meghatároztuk a haloinspiráló baktériumok jelenlétét és következtettünk aktivitásukra különböző mikrokozmosz körülmények között. Vizsgálatunk célja az volt, hogy stimuláljuk a TCE teljes bomlását, és hogy meghatározzuk az *in situ* bioremediáció során alkalmazható legsikeresebb elektron donort.

VI. Anyag és módszer

6.1. A minták származási helye

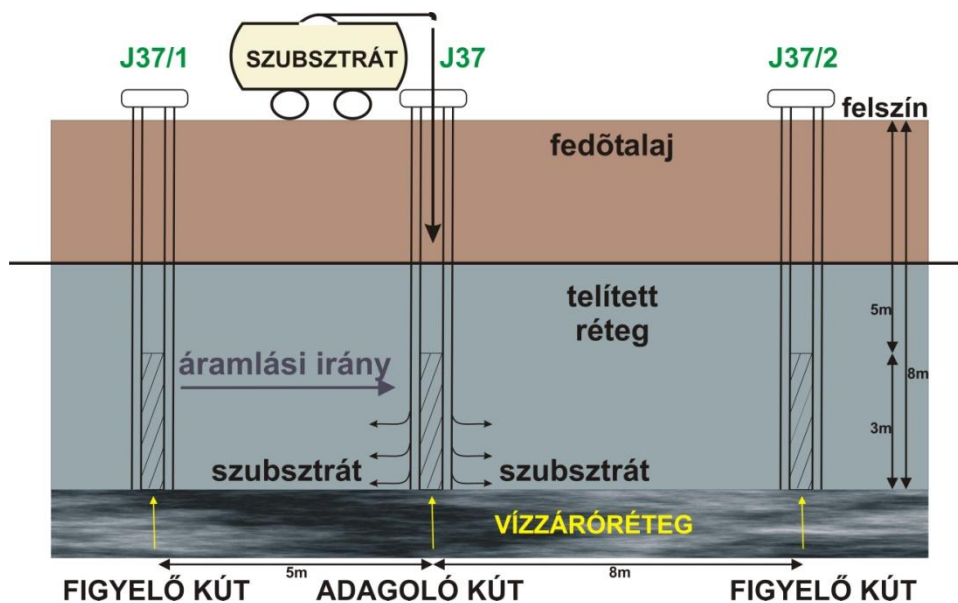
6.1.1. Az Archaea diverzitás-vizsgálatokhoz és a háromfázisú mikrokozmoszok összeállításához használt minták származási helye

A minták (J10, J18/2, J37, J37/1, J37/2) Magyarország egy halogénezett szénhidrogénnel szennyezett ipari területéről származtak, ahol korábban földalatti tartályokban raktározták a TCE-t és ahol a helytelen kezelés, illetve szivárgások következtében halogénezett szénhidrogének halmozódtak fel a felszín alatti környezetben. A területről csupán egy sematikus ábrát (7. ábra) áll módunkban bemutatni, EOVS (egységes országos vetület) koordinátákkal ellátott, részletes térképet a terület tulajdonosával kötött titoktartási szerződés értelmében nem tüntethetünk fel a dolgozatban.



7. ábra. A szennyezett terület sematikus ábrázolása a figyelő (●) és az adagoló kutak (▲) jelölésével. (A vastag fekete nyíl a területen a talajvíz uralkodó áramlási irányát mutatja.)

Az Archaea diverzitás-vizsgálatokhoz a mintavételi kútjainkat úgy választottuk meg, hogy a szennyezett terület különböző pontjairól, illetve a szennyezés különböző mélységeiből és a csóva eltérő koncentrációjú pontjaiból egyaránt tudjunk mintát venni. Ennek megfelelően választottunk ki három 8 méter (J37, illetve J37/1 és J37/2), egy 12 méter (J10) és egy 18 méter mély kutat (J18/2). A J18/2 kút volt a legerősebben szennyezett (a szennyezési csóva forrásánál található), míg a J10 kút a legkevésbé. Mindkettő *figyelő kútként* működött, a szubsztrát beadagolása külön kiépített *adagoló kutakon* keresztül történt, melyekből nem történt mintavétel, mivel ezekből a kutakból származó mintákból a beadagolás miatt nem kaptunk volna megbízható eredményeket. Az adagoló kutak mind a J18/2, mind pedig a J10 kúttól észak-nyugati irányban voltak találhatóak. A J37, J37/1 és J37/2 kutak egy úgynevezett *árok-kút rendszerben* helyezkedtek el. A szubsztrát beadagolása a J37 kúton keresztül történt, a monitorozás pedig egy ettől áramlási iránnyal ellentétesen (J37/1), illetve egy áramlási iránnyal megegyező (J37/2) irányban elhelyezkedő kútból vett mintákból történt (8. ábra).



8. ábra. A kísérleti kúrendszer sematikus ábrája.

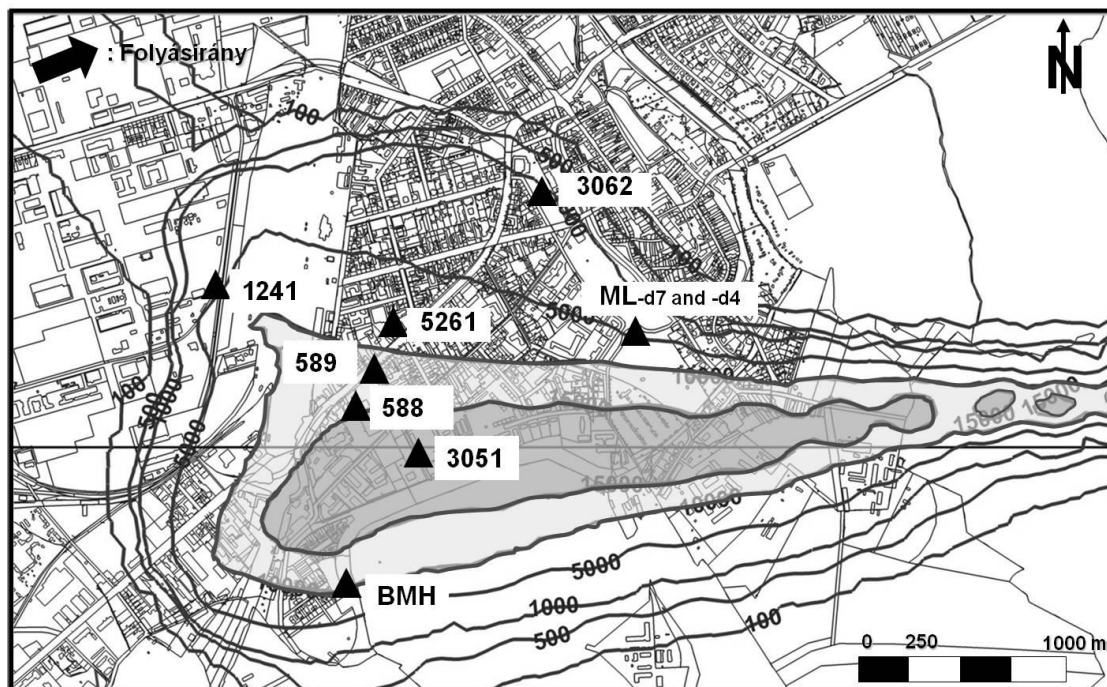
A szennyezett területen több éve tartó fizikai kármentesítés zajlott, mintavételeink előtt, illetve azokkal párhuzamosan pedig előzetes laboratóriumi mikrokozmosz kísérleteken alapuló (Révész és mtsai 2006, Mohr

2006, Mészáros 2007) szerves szubsztrát beadagolás (biostimuláció) történt 7-20 héten keresztül. Az adagolás során a J10-es kút adagoló kútjába 7,8 m³, a J18/2 kút adagoló kútjába 10 m³, míg a J37 kútba 1,6 m³ megfelelő szerves szubsztrát bejuttatására került sor.

A háromfázisú mikrokozmoszok összeállításához használt talajvízminták a J18/2 kútból származtak. A talajvízmintákat egy évvel az utolsó *in situ* bioremediációs beavatkozás után gyűjtöttük.

6.1.2. Bitterfeld/Wolfen terület

A *Dehalococcoides* diverzitás-vizsgálatokhoz és a SNUPE módszer fejlesztéséhez használt talajvíz, mesterséges láp és mikrokozmosz minták mind egy klórozott eténkel szennyezett csóvából származtak, ami a Bitterfeld/Wolfen ipari szennyezett területen (Szász-Anhalt), Németország keleti felén található (9. ábra).



9. ábra. A c-DCE szennyezett terület (Bitterfeld/Wolfen, Németország) sematikus ábrázolása, a kutak jelölésével (▲). A vonalakon feltüntetett c-DCE koncentrációt ug/l-ben adtuk meg. A vastag fekete nyíl a területen uralkodó ármlási irányt mutatja.

A vizsgált terület teljes geológiai szerkezetét és hidrogeológiai jellemzőit már korábban részletesen leírták (*Heidrich és mtsai 2004, Wycisk és mtsai 2003*). A Bitterfeld/Wolfen régió 25 km²-nyi, becslések alapján kb. 200 millió m³ szennyezett talajvizet tartalmaz (*Wycisk és mtsai 2003*). A korábbi kémiai ipar hozadékaként a talaj, a felszíni vizek és a talajvíz is nagyon szennyezetté vált ezen a területen. A szennyezők legnagyobb és legfontosabb részét az alifás klórozott vegyületek adják, bár mások, mint pl. a klórozott aromások, hexaklór-ciklohexán vagy BTEX is jelen vannak. A mintavételi területen a c-DCE a fő szennyező, ami a PCE és TCE deklorináció eredményeképpen halmozódott fel (lásd még Melléklet 2. táblázat).

6.2. Mintavétel

6.2.1. Talajvíz mintavétel az Archaea diverzitás-vizsgálatokhoz

Már kiépített mintavevő kutakból, 8, 12 és 18 m mélyről, mintánként 2 liter talajvízmintát vettünk folyamatos nitrogén gáz beáramoltatása mellett, hogy megőrizzük a minták anaerobitását. A vízmintákat a laboratóriumba szállítás után azonnal feldolgoztuk további biológiai vizsgálatokhoz, illetve továbbküldtük kémiai vizsgálatra. Minden esetben több párhuzamos mintával dolgoztunk, amelyeknek kémiai eredményeit átlagoltuk, a biológiai vizsgálatok során pedig kompozit mintákat vizsgáltunk.

6.2.2. *Dehalococcoides* diverzitás-elemzés mintái

6.2.2.1. Talajvíz és mesterséges lág

A c-DCE csóván belüli kutak elhelyezkedését az 8. ábra szemlélteti. Az 1241, 3051, 3062, ML-d7, ML-d4 és BMH kutakból származó talajvízmintákat perisztaltikus víz alá süllyeszthető szivattyúval gyűjtöttük (MP1 Grundfos, Bjerringbro, Dánia). Oldott oxigént, pH-t, vezetőképességet, redox potenciált és hőmérsékletet mértek nekünk közvetlenül a területen. A reprezentatív mintavételt úgy biztosítottuk, hogy talajvíz mintákat csak az után vettünk, hogy

legalább egyszer a kút teljes térfogatát kiszivattyúztuk és folytattuk egészen addig, amíg a terepen mért paraméterek kevesebb, mint 5%-ban változtak (Imfeld és mtsai 2008).

A mesterséges lápot folyamatosan a BMH kútból származó, anoxikus talajvízzel láttuk el, amelyben c- és t-DCE voltak a fő szennyezők (Melléklet 2. táblázat). A mesterséges láp jellemzőit már korábban leírták Imfeld és munkatársai (2010). A vízmintákat a mesterséges láp homokkal töltött szakaszából, egy függőleges mentén, négy pontból steril üveg fecskendőt alkalmazva gyűjtöttük (kompozit mintával dolgoztunk a továbbiakban), 430 nappal a kísérlet kezdete után, amikor már az anaerob körülmények uralkodtak (Imfeld és mtsai 2010).

A talajvíz és a mesterséges láp vízmintákat szétosztottuk, a VOC (Volatile Organic Compound – illékony szerves vegyület) koncentráció mérésekhez csövekbe, melyeket teflonnal bevont szeptumokkal zártunk le (fejgáz mentesen), a geokémiai elemzéshez 20 ml HDPE (High-Density Polyethene – nagy sűrűségű polietén) üvegekbe, és a mikrobiológiai vizsgálatokhoz, a korábban leírtaknak megfelelően (Imfeld és mtsai 2008 és 2010), 1 literes üvegekbe (talajvíz minták), illetve 120 ml-es csövekbe (mesterséges láp minták). A talajvíz és mesterséges láp mintákat jégre helyeztük és egyenesen a laboratóriumba szállítottuk kémiai elemzés céljából. A későbbi mikrobiológiai vizsgálathoz gyűjtött mintákat azonnal 4°C-ra hűtöttük, hogy ezzel is késleltessük a közösség átalakulási folyamatait és a mintavételt követően kevesebb, mint 5 órán belül leszűrtük (Nijenhuis és mtsai 2007, Imfeld és mtsai 2010), és megkezdtük a nukleinsav kivonását.

6.2.2.2. Mikrokozmoszok és dúsítók

A mikrokozmoszok és a dúsító kultúrák összeállításához a 3051, az 588/589 és az 5261 kutakból származó talajvízmintákat használtuk.

6.2.3. Háromfázisú mikrokozmoszokhoz használt minták vétele

Anaerob körülmények között, 2 literes palackokba, gázfázis nélkül, folyamatos nitrogén áramoltatással vettünk talajvízmintát a J18/2 kútból (6. ábra) lassú áramlásos („low flow”) technikával, amelynek során az indikátorparaméterek (pl. hőmérséklet, pH) állandósulásáig történt a szivattyúzás. Az üvegeket teflon borítású kupakkal zártuk le. A mintákat a laboratóriumba való szállításukig 4°C-on tartottuk és a beérkezést követően azonnal feldolgoztuk.

6.3. A kísérletek összeállítása

6.3.1. A *Dehalococcoides* diverzitás-vizsgálathoz használt mikrokozmoszok és dúsító kultúrák

A mikrokozmoszok Bitterfeldeből származó talajvíz felhasználásával készültek és *Dehalococcoides* szervezetek elszaporodása történt meg bennük. Noha ezek a dúsító kultúrák képesek voltak a PCE és a TCE bontására eténig (Nijenhuis és mtsai 2007, Cichocka és mtsai 2010), *tceA*, *ucrA* és *bvcA* géneket nem sikerült bennük azonosítani (Kaufhold és mtsai 2013). A mikrokozmoszokat és a dúsító kultúrákat Nijenhuis és munkatársai (2007) és Cichocka és munkatársai (2010) állították össze, mi csupán a mintavételekben vettünk részt.

A mikrokozmoszok összeállítását korábban Nijenhuis és munkatársai (2007) leírták. Röviden: a laboratóriumi mikrokozmoszok három különböző forrásból származtak. Az első összeállításnál a 3051 kútból származó talajvizet használták fel. Ez a kút a PCE és TCE csóva szegélyénél helyezkedett el, de nagy koncentrációban tartalmazott DCE-t is. A második összeállításnál az 588/589 kútból származó talajvizet használták. Ez a kút csak kis koncentrációban tartalmazott klórozott eténeket (Melléklet 2. táblázat). A harmadik összeállításnál az 5261 kútból származó talajvizet használták. Ebben a kútban a VC, a c- és t-DCE voltak a fő szennyezők. A mikrokozmoszokhoz

elektron donort (laktát vagy acetát) és elektron akceptort (VC, PCE vagy t-DCE) adagoltak (lásd 6. táblázat).

A dúsító kultúrák a 3051 kútból származó talajvízzel készült mikrokozmoszokból származtak, ahogyan azt *Nijenhuis és munkatársai* (2007), illetve *Cichocka és munkatársai* (2010) leírták (lásd az 6. táblázatot is – 89. oldal). Röviden: a mikrokozmoszok 120 ml-es üvegekben készültek 100 ml talajvíz felhasználásával, amelyeket teflonnal bevont gumidugókkal zárták le. Laktátot (3 mM) használtak elektron donorként és PCE-t (100 μ mol/l) elektron akceptorként. Az aktív mikrokozmoszokat háromszor továbboltották szintetikus tápközegbe *Zinder és munkatársai* (1998) leírását (lásd *Melléklet*) követve, majd PCE-t adagoltak hozzá elektron akceptorként és laktátot elektron donorként és szénforrásként, illetve hidrogént elektron donorként (*Cichocka és mtsai* 2010). A harmadik átoltást alkalmazták inokulumként a dúsító kultúrákhoz. A dúsító kultúrák egyéb jellemzőit (funkciógén-alapú elemzések nem történtek) *Cichocka és munkatársai* írták le (2010). A dúsító kultúrákat 20°C-on, rázatás nélkül inkubálták. A későbbi DNS kivonáshoz szükséges mintavétel steril fecskendővel történt mind a mikrokozmoszok, mind pedig a dúsítók esetében. 1.5 ml mintát 16.000 g-n 30 percig centrifugáltunk.

6.3.2. Dúsító kultúrák létrehozása a SNuPE módszer fejlesztéshez

Egy előzetes kutatás során *Cichocka és munkatársai* (2010) olyan dúsító kultúrát készítettek, amely képes volt a PCE, a TCE, a c-DCE és a VC reduktív deklorinációjára eténig. Ez a kevert kultúra többségében (83%) *Dehalococcoides* baktériumokat tartalmazott és BTF08 jelölést kapott, utalva ezzel a származási helyére (Bitterfeld). Ahhoz, hogy ezt a dúsító kultúrát molekuláris szinten is jellemezni tudják, *Kaufhold és munkatársai* (2013) amplifikálták az RDáz homológ géneket olyan primerekkel, amelyek az RDáz géneken belüli konzervatív régiókat célozták meg. Az amplikonokat klónozták, újra amplifikálták plazmidokból, szűrték és csoportosították.

Anaerob mikrokozmoszokat állítottunk össze. 50 ml-es szérüművegeket használtunk, melyekbe 25 ml tápközeget (*Zinder 1998, lásd Melléklet*) töltöttünk, a gáztérben 70% N₂ és 30% CO₂ arányt biztosítottunk és teflonbevonatú gumidugóval, illetve alumínium záró-gyűrűvel zártuk le az üvegeket. Minden üvegbe NaHCO₃-ot (1 g/l), Na₂S-ot (25 mg/l) és vitaminokat (*Zinder 1998*) adagoltunk. Acetát (3 mM) szolgált szénforrásként, a hidrogén (túlnyomás) pedig elektron donorként. Elektron akceptorként VC (0,3 ml gáz), c-DCE, TCE és PCE (mind 1 µl tiszta oldószer) szolgált. A különböző típusú dúsító kultúrákból öt-öt párhuzamost készítettünk, három-három üveget oltottunk be 1 ml (4% v/v) *BTF08* dúsító kultúrával, míg két-két üveg negatív, abiotikus (autoklávozott, inokulum nélküli) kontrollként szolgált. Ennek megfelelően, az üvegeket az alábbi jelölésekkel láttuk el: 1.1-1.3: VC-dal kezelt mikrokozmoszok, 1.4-1.5: VC-dal kezelt abiotikus kontrollok, 2.1-2.3: PCE-nel kezelt mikrokozmoszok, 2.4-2.5: PCE-nel kezelt abiotikus kontrollok, 3.1-3.3: TCE-nel kezelt mikrokozmoszok, 3.4-3.5: TCE-nel kezelt abiotikus kontrollok, 4.1-4.3: c-DCE-vel kezelt mikrokozmoszok, 4.4-4.5: c-DCE-vel kezelt abiotikus kontrollok. Az üvegeket 20°C-on, sötétben, fejjel lefelé inkubáltuk rázatás nélkül.

6.3.3. Háromfázisú mikrokozmoszok összeállítása

A mikrokozmosz kísérletekhez 2 liter talajvizet koncentráltunk 0,2 µm (Millipore, Billerica, MA, USA) pórusméretű membránon szűrve anaerob körülmények között, két alkalommal az alábbi eljárást követve: a talajvízmintákat tartalmazó üvegeket HPLC csavaros kupakkal zártuk le, gázzáró politetrafluoretén (PTFE) csöveket helyeztünk a csavaros kupakon található lyukakba. A szűrés alatt, a talajvízmintába folyamatosan nitrogén gázt áramoltattunk az egyik PTFE csövön keresztül annak érdekében, hogy az üvegben folyamatos túlnyomás biztosítsunk, kényszerítve ezáltal a talajvíz mintát, hogy a másik csövön át távozzon a szűrőberendezésre, ami a 0,2 µm

pórusméretű membránt tartalmazta. A szűrőberendezés felső részét folyamatos szén-dioxid áram alatt tartottuk, így elkerülve az oxigén beoldódását (10. ábra).



10. ábra. A talajvízminták szűrése anaerob körülmények között.

Minden, a koncentrált őshonos baktériumokat (a membránon maradó sejtszuszpenziót) tartalmazó membránt 60 ml steril, anaerob, nyomelemtartalmú tápközegbe helyeztük (Zinder 1998, lásd Melléklet) és az üvegeket egy éjszakán át rázattuk. Másnap 120 ml-es szérumüvegekbe 65,8 ml tápközeget és 5 g 0,3 mm szemcseméretű szitált talajt töltöttünk, majd teflon borítású gumidugóval (Wheaton Science Products, Millville, NJ, USA) és alumínium záró-gyűrűvel zártuk le azokat. Előzetes kísérletek során, kétfázisú rendszerekben a TCE részleges degradációját tapasztaltuk, ami valószínűleg a tapadási felület hiányával és ezáltal a biofilm képzés nehézségeivel volt magyarázható. Ezért alkalmaztunk talajt harmadik fázisként, hogy biztosítsuk a megfelelő felületet a baktériumok megtelepedéséhez. A szérumüvegeket 50 percig autoklávoztuk (121°C, 1 atm), majd lehűlést követően, a gázfázist steril nitrogén gázra cseréltük. Minden mikrokozmoszhoz NaHCO_3 -ot (1 g/l), Na_2S -ot (25 mg/l) és vitaminokat adagoltunk. Ez alkalommal is az acetát (3 mM) szolgált szénforrásként, a hidrogén (túlnyomás) pedig elektron donorként. A biotikus (inokulumot tartalmazó) kontrollokhoz nem adagoltunk sem szénforrást, sem pedig elektron donort. TCE (417 μmol tiszta oldószer) szolgált elektron akceptorként. Az abiotikus (autoklávozott, inokulumot nem tartalmazó) kontroll kivételével, Fennell és Gossett (2003) leírását követve, minden egyes mikrokozmoszhoz random adagoltunk 8,5 ml anaerob

tápközeget, ami a leszűrt talajvízből származó membránt (így a koncentrált talajvíz mintát) tartalmazta. A különböző típusú mikrokozmoszokból három-három párhuzamost készítettünk. A kultúrákat fejjel lefelé inkubáltuk, sötétben, 12°C-on, rázatás nélkül. Az abiotikus kontrollokat három egymást követő napon újra autoklávoztuk. Minden párhuzamosból vettünk mintát a 6., 20., 50., 58., 62., 87., 91., 115., 122., 143., 177., 203. és a 220. napon a kémiai mérésekhez, illetve a 0. (kiindulási inokuláns) és a 220. napon a biológiai vizsgálatokhoz. Minden általunk használt vegyszerből a legnagyobb tisztaságút alkalmaztuk és a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, USA), vagy a Merck-től (Darmstadt, Németország) vásároltuk azokat. Meghatároztuk a mikrokozmoszokhoz használt talaj kémiai paramétereit (pH, teljes foszfor, teljes nitrogén, teljes szerves szén, teljes szerves szén, teljes szén, huminsav tartalom – lásd *Melléklet 4. táblázat*).

6.4. Kémiai vizsgálatok

6.4.1. Talajvízminták vizsgálata

A kémiai mérésekre egy akkreditált laboratóriumban került sor. Vízkémiai paramétereket (*pH* – MSZ ISO 10523:2003, EPA 9045B, *szulfát* – MSZ EN ISO 10304:1998, EPA 9056:1994, *összes Fe és összes Mn* – MSZ 1484-3:2006, EPA 6010b:1996, MSZ EN ISO 11885:2000, *TOC* – MSZ EN 1484:1998, DIN ISO 10694), *etánt, etént, metánt* (WBSE-27:2002) és *halogénezett szénhidrogéneket* (MSZ 1484-5:1998, DIN 38407-75:1991, EPA 8260C:2006) mérték számunkra 2 x 40 ml vízmintából.

6.4.2. Gázkromatográfiás módszerek

6.4.2.1. A németországi mikrokozmosz minták elemzése

A klórozott etének és az etén koncentrációjának meghatározása gázkromatográfiával (GC) (Varian Chrompack CP-3800, Middelburg, Hollandia) történt, lángionizációs detektorral (FID – Flame Ionization Detector),

30 m x 0,53 mm GS-Q oszlop (J&W Scientific, Waldbronn, Németország) alkalmazásával, ahogyan azt *Nijenhuis és munkatársai* leírták (2007).

Az alábbi hőprofilt alkalmaztuk: 1 perc 100°C, + 50°C/perc 225°C-ig, 2,5 percig tartva. A FID 250°C-on működött, a vivő gáz hélium volt ($0,69 \times 10^5$ Pa; 11.5 ml/perc). Ezzel a módszerrel képesek voltunk elválasztani az etént, VC-ot, c-DCE-t, TCE-t és PCE-t. A mintavétel automatikus volt, HP 7694 autosampler-t (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) használtunk, 0,5 ml gáztér mintát adagoltunk 10 ml-es autosampler mintavételi üvegekbe, melyeket előtte héliummal „mostunk” át, majd teflonbevonatú gumidugóval és alumínium záró-gyűrűvel zártunk le.

6.4.2.2. A magyarországi mikrokozmosz minták elemzése

A biodegradációs folyamatokat gázkromatográfiás (gázkromatográf: YL6100 GC, YL Instrument Co., Ltd., Hogle-dong Anyang, Dél-Korea) módszerekkel követtük nyomon, láng ionizációs detektálást és 15 m x 0,53 mm HP_PLOT Q oszlopot (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) alkalmazva. A vivő gáz 5,0 hélium (Linde, München, Németország) volt. Az injektor „split” módban üzemelt 1:20 aránnyal, az állandó vivőgáz áramlás 3,8 ml/min volt. A következő hőprofilt alkalmaztuk: 2 perc 60°C, 25 perc 250°C-ig, majd tart 0,4 percig. A FID 250°C-on működött. A levegő- és hidrogénáramlást 300 ml/perc-re, illetve 30 ml/perc-re állítottuk. Ezzel a módszerrel képesek voltunk elválasztani a metánt, etént, etánt, vinil-kloridot, c-DCE-t és a TCE-t. Módszerünk ellenőrzéseképpen hét mérésből meghatároztuk a szórás, a variációs koefficiens, a kimutatási és a meghatározási határ értékeket (*Melléklet 8. táblázat*). Kalibrációs standardokat készítettünk ismert mennyiségű vegyszer (Sigma Aldrich és Supelco, Bellefonte, PA, USA) adagolással. Ezen sztenderdek ugyanolyan gáz-, víz-, illetve talajfázis arányokkal készültek, mint a mikrokozmoszok és ugyanúgy mintáztuk és tároltuk őket. A kézi injektálás során 100 µl gáz mintát adagoltunk steril, gázzáró Hamilton fecskendővel. A mintázások előtt a mikrokozmoszokat 12 órán át szobahőmérsékleten (kb. 25°C)

inkubáltuk az illékony vegyületek fázisegyensúlyának beálltáig. Az adatokat YL-Clarity Chromatography Data System (YL Instrument Co., Ltd.) szoftverrel rögzítettük.

6.5. Nukleinsav kivonás

6.5.1. DNS izolálás

Az Archaea közösségi vizsgálatok során a DNS izolálást a membrán „szűrőkből” végeztük. Mintánként 2 l talajvizet szűrtünk át 0,2 µm (Millipore, Billerica, MA, USA) pórusméretű nitrocellulóz membránon, a DNS izolálást UltraClean™ Water DNA Isolation Kittel (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA) a gyártó előírásait követve hajtottuk végre.

A *Dehalococcoides* diverzitás-vizsgálatoknál a DNS kivonás a membrán szűrőkből és a mikrokozmosz mintákból történt. A talajvíz mintákból 2 x 1 litert szűrtünk le, a mesterséges lág mintákból pedig 120 ml-t, majd üveggyöngyös sejtmalommal (FastPrep®, Qbiogene, Irvine, CA, USA) tártuk fel a sejteket, FastDNA® kittel vontuk ki a DNS-t (BIO101, La Jolla, CA, USA), amit végül 50 µl nukleáz-mentes vízben eluáltunk.

A háromfázisú mikrokozmoszok esetében az üvegeket erőteljes rázatásnak tettük ki, annak érdekében, hogy egységes kompozit mintát kapjunk, majd 1.5 ml vízmintát vettünk minden mikrokozmoszból a közösségi DNS kivonáshoz. A sejteket 14.000 g-n, 30 percig tartó, 4°C-on történő centrifugálással ülepítettük. A DNS kivonást a centrifuga cső falára tapadt sejtekből végeztük MoBio Soil Kit (MO BIO Laboratories Inc.,) alkalmazásával, a gyártó útmutatását követve, az alternatív lízis protokollt alkalmazva. A DNS-t 45 µl RNáz mentes desztillált vízben oldottuk fel és későbbi felhasználásig - 20°C-on tároltuk.

A DNS kinyerését minden esetben agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. 1 %-os agaróz gélre öntöttünk (1 g agaróz, 10 ml 10xTBE, 90 ml ddH₂O, 0,5 µl/ml etídium-bromid). A gél zsebeibe 5 µl DNS-mintát és 3 µl

töltőpuffert (30 v/v % glicerín, 0,25 mM brómfenolkék), az első zsebbe 1,8 µl molekulasúly markert (Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker, 3, Fermentas, Vilnius, Litvánia) pipettáztunk. A gélt 1xTBE pufferben (TRIS-bázis 10,78 g/l; bórsav 5,5 g/l; EDTA 0,74 g/l; pH 8,3) 100 V-on, 20 percig futtattuk, majd UV fényben vizsgáltuk.

A DNS koncentrációt és minőséget spektrofotometriásan (Nanodrop ND1000; NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) határoztuk meg.

6.5.2. RNS izolálás

A SNuPE módszer fejlesztése során teljes RNS-t izoláltunk a különböző kezelésű mikrokozmosz mintákból a növekedési illetve a redukzív deklorinációs fázisban, a 66. napon. Minden esetben egy, a leghatékonyabban működő, mikrokozmoszt választottuk ki vizsgálatainkhoz. A teljes RNS kivonást 1,5 ml mikrokozmosz mintából végeztük, miután azt 16.000 g-n 30 percen át, hűtve (4°C) centrifugáltuk. Az RNS kivonáshoz RNeasy mini kitet (Qiagen) használtuk, a gyártó ajánlásait követve, néhány módosítással. A pelletet 700 µl RLT pufferben (Qiagen) – amihez előzőleg 7 µl merkaptotetanolt adtunk – szuszpendáltuk és Lysing Matrix B 2 ml-es üveggyöngyös sejtfeltáró csőbe (MP Biomedicals, Illkirch Cedex, Franciaország) adagoltuk. A csöveket jégre helyeztük 2 percre, majd a sejteket mechanikailag tártuk fel FastPrep készülék (FastPrep FP120; Qbiogene, Inc., Franciaország) segítségével 20 másodpercig 6.0 rázatási fokozatot alkalmazva. A csöveket ismét jégre helyeztük 2 percre, majd centrifugáltuk 1 percig 16.000 g-n. A felülúszót átvittük egy új csőbe és 600 µl 70%-os etanolt adagoltuk hozzá. Ezután a keveréket RNeasy csőbe (Qiagen) helyeztük és a tisztítási, illetve eluálási lépéseket a gyártó ajánlásait követve végeztük.

Azért, hogy az RNS mintáink biztosan DNS szennyezéstől mentesek legyenek, az RNS kivonást követően, egy kiegészítő DNáz kezelést is

végeztünk, DNA Free kit-et (Applied Biosystems/Ambion, Darmstadt, Németország) alkalmazva. A mintákat felhasználásig -20°C-on tároltuk.

A háromfázisú mikrokozmosz minták esetében a teljes RNS-t 1,5 ml mikrokozmosz mintából vontuk ki, 14.000 g-n 30 percig 4°C-on történő centrifugálást követően egy alternatív protokollt követve. A kiülepedett sejteket 1,5 ml Trizolban (Gibco BRL/Life Technologies, Breda, Hollandia) oldottuk, majd átvittük egy Lysing Matrix B (MP Biomedicals) csőbe. Lehűtöttük, majd MM301 típusú sejtmalomban (Retsch, Haan, Németország) feltártuk a sejteket (30 másodperc, 11 rev/s frekvencia). A mintákat szobahőmérsékleten inkubáltuk 20 percig, majd centrifugáltuk 12.000 g-n 14 percig 4°C-on. A felülúszót átvittük egy új csőbe és hozzáadtunk 300 µl kloroformot. A csöveket ismét szobahőmérsékleten inkubáltuk 15 percig, majd centrifugáltuk 12.000 g-n 14 percig 4°C-on. A felső, vizes fázist továbbvittük egy új csőbe és 600 µl 96%-os etanolt adtunk hozzá. A keveréket átvittük egy RNeasy oszlopra és ettől a lépéstől kezdve az RNeasy Mini Kit (Qiagen) RNS tisztítási protokollját követtük a gyártó javaslatai alapján. Az RNS minták DNS szennyezettségét PCR-rel ellenőriztük.

Az RNS mennyiségét és tisztaságát minden esetben spektrofotometriásan határoztuk meg, a méréseket UV/VIS spektrofotométeren (Nanodrop ND 1000) végeztük.

6.6. Polimeráz láncreakció (PCR)

6.6.1. 16S rRNS Bacteria specifikus PCR

A Bacteria-specifikus PCR-t univerzális 16S rRNS gén primerekkel 27F (Lane 1991) és 1387R (Heuer és mtsai 1997) végeztük, a következő amplifikációs programot követve: 98°C (5 perc), majd 30 ciklus: 94°C (30 mp), 52°C (30 mp), és 72°C (1 perc), befejezőként 10 perc 72°C. Az 50 µl PCR mix a következőket tartalmazta: 5 µl 10xPCR puffer (Fermentas), 0,3 µM forward és reverz primerek, 2,5 U DreamTaq DNS polimeráz (Fermentas), 0,2 mM

deoxinukleozid trifoszfát (Fermentas), 1 µl BSA (Bovine Serum Albumin) (Fermentas), 0,25 µl genomiális DNS vagy 4 µl cDNS és molekuláris tisztaságú víz.

6.6.2. 16S rRNS Archaea specifikus PCR

Steril PCR csövekbe a következőket mértük össze: 5 µl 10x PCR puffer (Fermentas), 3 µl MgCl₂ (Fermentas), 10 µl dNTP (Fermentas), 0,5 µl 109f primer (5' AC(G/T) GCT CAG TAA CAC GT 3'), 0,5 µl 934r primer (5' GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT 3'), 25 µl steril dH₂O és 5 µl DNS. A mintákat kémcső rázatón kevertük, majd centrifugálva gyűjtöttük össze a cső aljába. A kezdeti denaturációs lépést (98°C, 3 perc) követően 1 µl Taq polimerázt (Fermentas) pipettáztunk a csövekbe.

A touch down PCR ciklus hő profilja a következő volt: 98°C (3 perc), majd 94°C (30 mp), 60-50°C (30 mp) (20 cikluson keresztül 60°C-ról ciklusonként 0,5°C-kal csökkent az annealációs hőmérséklet, majd 50°C-on még 15 ciklus játszódtott le), és 72°C (1 perc), befejezőként 10 perc 72°C.

A PCR-eket GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA) készülékkel végeztük. A PCR termékeket 1%-os agaróz gélben detektáltuk elektroforézist követően a 2.4. fejezetben leírtaknak megfelelően. Molekulasúly markerként pUC Mix Marker, 8-t (Fermentas) használtunk.

6.6.3. Taxon-specifikus PCR

Taxon-specifikus 16S rRNS-alapú PCR amplifikációkat alkalmaztunk a deklorináló mikroorganizmusok kimutatására, úgy mint *Dehalococcoides* sp. (DHC-1, DHC-2), *Desulfitobacterium dehalogenans* (DD), *Dehalobacter restrictus* (DR), *Desulfomonile tiedjei* (DT), *Desulfuromonas chloroethenica* (DC). A DR, DD, DC és DT kimutatáshoz használt primerek a Melléklet 5. táblázatában találhatóak (El Fantroussi és mtsai 1997, Löffler és mtsai 2000, Smits és mtsai 2004). 1 µl a 16S

rRNS PCR-ből származó amplikont használtunk ezeknél a taxon-specifikus kimutatásoknál, nested PCR-ek során. A következő hőprofilt alkalmaztuk: 95°C (3 perc), 32 ciklus: 94°C (30 mp), 64°C (DC és DT) 65°C (DR és DD) (30 mp) és 72°C (1 perc), befejezésként 10 perc 72°C.

Nested PCR-t alkalmaztunk a *Dehalococcoides* nemzetség tagjai kimutatásánál: az első körben a forward primer a DHC1, a reverz primer pedig a DHC1377 volt, míg a második körben a forward primer DHC774 a DHC1212 reverz primerrel párosult. A hőprofilt *Hendrickson és munkatársai (2002)* leírását követve alkalmaztuk.

A PCR termékeket QIAquick PCR purification kittel tisztítottuk meg (Qiagen, Hilden, Németország), majd mennyiségüket NanoDrop ND 1000 készülékkel (NanoDrop Technologies, Inc.) határoztuk meg.

6.6.4. A reduktív dehalogenáz gének vizsgálata

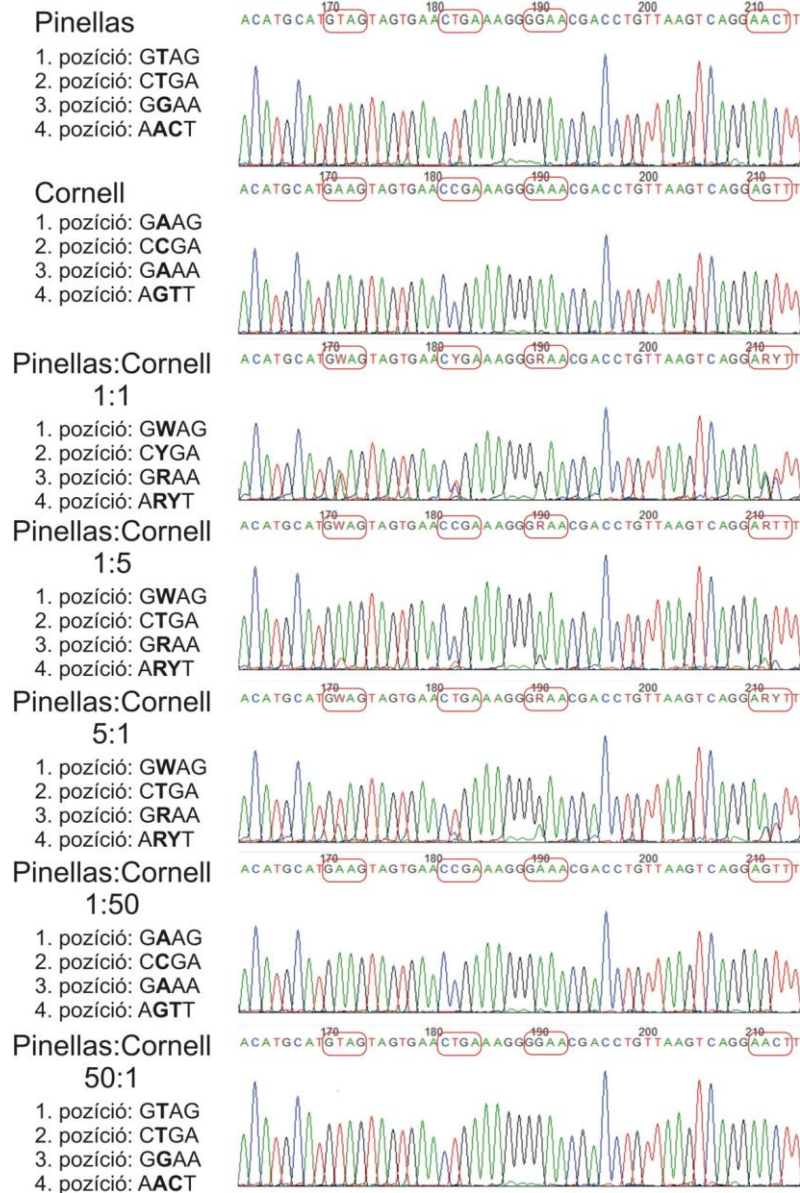
Három RDáz gént – *vcrA*, *bvcA* és *tceA* – amplifikáltunk PCR során. A *vcrA* gén amplifikációjához a *vcrAf* és a *vcrAr* (*Müller és mtsai 2004*) primereket használtuk, a *bvcA* gén amplifikációjához a *bvcAF* és a *bvcAR* (*Krajmalnik-Brown és mtsai 2004*) primereket, míg a *tceA* gén amplifikációjához a 797f és 2490r (*Magnuson és mtsai 2000*) primereket (*Melléklet 6. táblázat*). A PCR jellemzői a következők voltak: 15 perc 95°C, 30 cikluson keresztül 45 sec 94°C, 1 perc 55°C (*vcrA*), vagy 52°C (*bvcA* és *tceA*), 1 perc 72°C, befejezésként 7 perc 72°C. *TceA* (*Dehalococcoides* sp. FL2-ből), *vcrA* (GT törzsből) és *bvcA* (BAV1 törzsből) gént tartalmazó plazmidokat használtunk pozitív kontrollként a PCR során.

6.7. Kalibrációs eljárások a *Dehalococcoides* diverzitás-vizsgálatok során

A diverzitás-vizsgálatok során a *Dehalococcoides* specifikus nested PCR-t követően, az amplikonokat azonnali, klónozás nélküli bázissorrend meghatározásnak vetettük alá DHC1212 primert használva. Big Dye

Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kitet V3.1 (Applied Biosystems) használtunk a nukleotid sorrend meghatározáshoz. A szekvenáló reakciót a gyártó ajánlásának megfelelően végeztük. A szekvenáló reakció termékeit ABI PRISM 3130xl genetikai analizátoron (Applied Biosystems) választottuk el. A bázissorrend vizsgálatot MEGA6 szoftverrel (Tamura és mtsai 2013) végeztük. A rokon szekvenciák keresését a National Center for Biotechnology Information (Altschul és mtsai 1997) basic local alignment search tool programjával végeztük. Az összes kinyert szekvencia egyértelműnek bizonyult.

A 16S rRNS gén V2 és V6 régiójában található specifikus bázis szubsztitúciós mintázat alapján a *Dehalococcoides* nemzetség három alcsoportra osztható: Cornell, Victoria és Pinellas (Hendrickson és mtsai 2002). Azért, hogy megbecsülhessük a Cornell és Pinellas alcsoportok diverzitását a *Dehalococcoides*-en belül a különböző mintákban direkt bázissorrend elemzéssel, meghatároztuk a kimutathatósági határértéket a filogenetikai alcsoport keverékeit templátként felhasználva (*D. mccartyi* 195 törzs és az 588/589 minta). A Victoria alcsoportot nem vizsgáltuk ebben a kísérletben, mivel annak európai előfordulását eddig nem detektálták (Hendrickson és mtsai 2002). A *Dehalococcoides* specifikus PCR amplikonjait a Pinellas és Cornell alcsoportoknak megfelelően kevertük a következő, mesterségesen beállított arányokban: 1:1, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 5:1, 10:1, 50:1 és 100:1 (11. ábra). A tisztított amplikon keverékeket direkt bázissorrend elemzésnek vetettük alá a DHC1212 primert használva és meghatároztunk a kimutathatósági határértéket. A bázissorrend meghatározás és a szekvenciák kiértékelése a fent leírtaknak megfelelően történt.



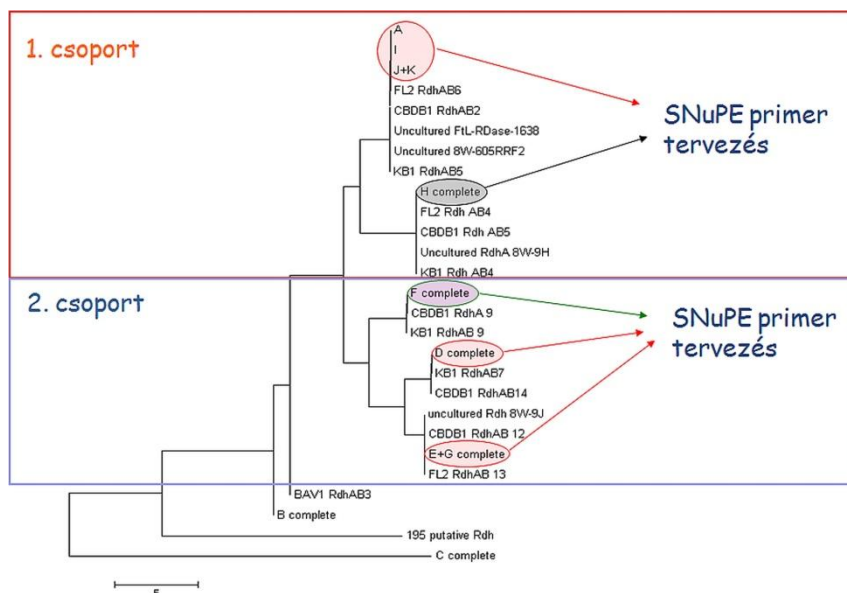
11. ábra. A *Dehalococcoides* sp. Pinellas és Cornell alcsoportok DNS keverékeinek bázissorrend meghatározás eredménye. 100% Pinellas, 100% Cornell, illetve 1:1, 1:5, 5:1, 1:50 és 50:1 keverékek. (W = A vagy T, Y = C vagy T, R = A vagy G)

6.8. Az új módszer fejlesztése - primer tervezés, csoport-specifikus PCR, SNuPE

Munkánk során *Kaufhold és munkatársainak* eredményeit (2013) felhasználva egy újfajta molekuláris próbát fejlesztettünk a különböző dehalogenáz csoportok expressziójának kimutatására, ami SNuPE módszeren alapult. Az amplikonokból származó szekvenciákat ismert szekvenciákkal

használtuk össze az NCBI BLAST programjával (Altschul és mtsai 1997). Filogenetikai fát készítettünk az azonosított RDáz szekvenciákból. Hét különböző RDáz csoportot azonosítottunk a klónszekvenciák alapján (12. ábra) és öt csoport-specifikus SNUPE próbát terveztünk, amelyek az öt főbb csoportot célozták meg (két – „B” és „C” - külcsoporthként szereplő, 1-1 klónnal reprezentált csoportot kihagytuk a vizsgálatból a nagymértékű szekvencia különbözőség miatt).

PCR és SNUPE primereket terveztünk az RDáz klónok szekvenciáit felhasználva. Olyan oligonukleotidokat állítottunk elő, amelyek specifikusak voltak a két fő RDáz csoportra: 1. csoport és 2. csoport, illetve az öt RDáz alcsoportra. „A-I-J-K” csoport, „D” csoport, „E-G” csoport, „F” csoport és „H” csoport (2. táblázat). A klónszekvenciákat MEGA6 szoftver (Tamura és mtsai 2013) segítségével illesztettük és a variábilis régiók vizsgálatával terveztük meg a különböző specifikus primereket.



12. ábra. A BTF08 dúsító kultúra klónszekvenciáin alapuló különböző redukív dehalogenáz gén csoportok. A filogenetikai fa Neighbor-Joining módszerrel, Maximum Composite Likelihood helyettesítési mátrix alkalmazásával készült.

A tervezett primerek tulajdonságait, úgy, mint GC-tartalom, olvadási hőmérséklet, inter-, és intramolekuláris kölcsönhatások (hajtű, illetve heterodimer képződés) stb. az IDT SciTools OligoAnalyzer 3.1 szoftverrel (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, USA) ellenőriztük.

2. táblázat. A két fő és az öt RDáz alcsoportra tervezett PCR és SNuPE primerek.

Csoport	Primer neve	Szekvencia (5'-3')
1. csoport	RedDehal_A_F	TTGACRAICCMACCATAGA
	RedDehal_A_R	CCTATRAWAAACCACATA
2. csoport	RedDehal_B_F	TTYCIYGAYYTGGATGA
	RedDehal_B_R	ATACCGCARGTTTYRCAGAA
„A-I-J-K” csoport	group A-I-J-K	(T) ₃ CGGGCTTACGGCGCTTCACTAG*
„H” csoport	group H	(T) ₂ ATGCCGCCAATATGAGCCG*
„D” csoport	group D	(T) ₉ CGGGGATATCGGTATAGAGC*
„E-G” csoport	group E-G	(T) ₁₄ CCGAAACAGGCAGCCGCTG*
„F” csoport	group F	(T) ₁₆ ACTGCCCTGTGCAATCGTTCC*

* Az alsó indexben lévő számok a poli-T módosítók hosszát jelölik.

A beépülő nukleotidokat, a jelölő színeket és az alcsoportok SNuPE próbából várható mintázatát a 3. táblázatban jelöltük.

6.8.1. Csoport-specifikus PCR

A redukzív dehalogenáz csoport-specifikus PCR-t (külön reakcióban az 1. és külön a 2. csoportra) a RedDehal_A_F és RedDehal_A_R illetve a RedDehal_B_F és a RedDehal_B_R primerekkel (2. táblázat) végeztük el a következő amplifikációs programot követve: 95°C (15 min), ezt követően 45 cikluson keresztül 94°C (40 s), 48°C (1. csoport), 46°C (2. csoport) (40 s) és 72°C (2 min 10 s), befejezésként 10 perc 72°C-on. A 25 µl PCR össztérfogatú PCR reakcióelegy a következőket tartalmazta: 2,5 µl 10xPCR puffer (Qiagen), 0,4 µM forward és reverz primer, 0,15 µl (5 U/µl) HotStartTaq DNS polimeráz (Qiagen), 0,2 mM dNTP keverék (Qiagen), 5 µl cDNS és DEPC kezelt, steril víz.

A PCR termékeket QIAquick PCR tisztító kittel (Qiagen) tisztítottuk és koncentrációját UV/VIS spektrofotométer segítségével (Nanodrop ND 1000) határoztuk meg. A be nem épült primereket és nukleotidokat enzimátikus úton távolítottuk el a reakcióelegyből előkészítve ezzel a további felhasználáshoz

(Syvänen 1999): 21 µl PCR terméket inkubáltunk 6 U SAP (shrimp alkaline phosphatase; Fermentas) és 6 U exonukleáz I (*ExoI*; Fermentas) enzimmel 30 µl végtérfogatra kiegészítve a gyártó által biztosított pufferrel. Az 1 órás 37°C-on történő inkubálást 15 perces 75°C-on történő enzim inaktiváció követte.

6.8.2. SNUPE

Az 1. csoporton belül a SNUPE reakció során az „A-I-J-K” csoportra specifikus primer egy timinnel (T) kell, hogy meghosszabbodjon, míg a „G” csoportra specifikus primer egy citozinnal (C) (3. táblázat).

A 2. csoporton belül az „F” csoportra specifikus primerhez egy adenin (A), a „D” csoportra specifikus primerhez egy timin (T), míg az „E-G” csoportra specifikus primerhez szintén egy timin (T) kell, hogy kapcsolódjon (3. táblázat).

3. táblázat. A várható kiegészült termékek és az öt RDáz alcsoport színekódjai

Csoport	Primer neve	A kiegészült termék hossza (bázis)	Az alcsoportok szekvenciájába beépülő bázis	Az alcsoportoknak megfelelő színekódok
1. csoport	group A-I-J-K	25 (+4)*	T	Piros
	group H	21 (+2)*	C	Fekete
	group D	29 (+4)	T	Piros
2. csoport	group E-G	33 (+2)	T	Piros
	group F	37 (+2)*	A	Zöld

* Zárójelben a nukleotid csúszásokat („drift”) jelöltük (lásd még 3.1.1. fejezet).

A ciklikus primer hosszabbodási reakciókat a Nikolausz és munkatársai (2008) által leírtak szerint végeztük el. A végtérfogat 10 µl volt, ami 1,5 µl 5x szekvenáló puffert (Applied Biosystems), 1,5 µl SNaPshot multiplex kit reagenst (Applied Biosystems), 1 µl primer keveréket (10 µM minden egyes primer), 3 µl tisztított PCR (az 1. illetve a 2. csoportra specifikus) terméket és 3 µl DEPC kezelt, steril vizet tartalmazott.

A SNUPE reakció hőprofilja a következő volt: 10 másodperc denaturáció 96°C-on, 5 másodperc annealáció 55°C-on, 30 másodperc extenzió 60°C-on, 45 cikluson keresztül. A be nem épült nukleotidok eltávolítására ismét 1 U SAP enzimet adagoltunk a reakcióelegyhez, majd 1 órán át 37°C-on inkubáltuk, amit

15 perc 75°C-on történő enzim inaktiváció követett. 2 µl kezelt termékhez 6 µl Hi-Di™ (többszörösen ioncserélt) formamidot (Applied Biosystems) (1. *oldat*) adtunk. 2 µl Gene Scan-120 LIZ (Applied Biosystems) belső méret sztenderdet és 6 µl Hi-Di™ formamidot kevertünk össze (2. *oldat*). Végül 2 µl 1. oldatot elegyítettünk 2 µl 2. oldattal és 6 µl HiDi formamiddal (3. *oldat*). Az összemérésnél a gyártó által ajánlott leírást követtük (Applied Biosystems). A precízebb összeméréshez volt erre szükség, a formamid nagy viszkozitása miatt. A 3. oldatot 95°C-on 5 percig denaturáltuk, majd jégre helyeztük.

A DNS minták elektroforetikus elválasztása ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) készüléken történt. A kapilláris elektroforézis során 36 cm-es kapillárist, POP6 polimert, illetve E5-ös filtert használtunk (Applied Biosystems) (Nikolausz és mtsai 2008). Az adatokat GeneMapper szoftverrel (Applied Biosystems) elemeztük. A csúcs adatokat a mintákkal együtt futó LIZ-120 belső méret sztenderdhez (ami 15, 20, 25, 35, 50, 62, 80, 110 és 120 nukleotid hosszúságú fluoreszcens jelölésű fragmentumokat tartalmazott) viszonyítva normalizáltuk.

6.9. Reverz transzkripció

Az RT reakcióhoz RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit-et (Fermentas), illetve random hexamer primert használtunk és a gyártó útmutatását követtük. Minden mintához összemértük a reakciót reverz transzkriptáz nélkül is, ellenőrizve ezzel a lehetséges DNS szennyezést.

6.10. T-RFLP elemzés

6.10.1. Archaea közösség elemzés

5 µl 10x PCR puffert (Fermentas), 3 µl MgCl₂-ot (Fermentas), 10 µl dNTP-t (Fermentas), 0,5 µl 344f_{HEX} primert (5'HEX ACG GGG TGC AGC AGG CGC GA 3'), 0,5 µl 934r primert, 28µl steril H₂O-t, 1 µl Taq polimerázt (Fermentas) és 2 µl tisztított DNS-t mértünk össze steril PCR csövekben. A PCR reakció hő profilja a touch down PCR ciklus hő profiljával volt megegyező. A termékeket

agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, majd 0,6 µl-es Eppendorf csövekben összemértük az emésztési reakciót: 10 µl PCR termék, 0,3 µl enzim, 2 µl puffer és 7,7 µl dH₂O (4. táblázat). Az elegyet összekevertük és 3,5 órán át 37°C-on inkubáltuk.

4. táblázat. Az Archaea közösség T-RFLP elemzéséhez használt enzimek

Enzim	Puffer	Hasítási hely	Optimális hőfok
<i>MspI</i>	Y+/Tango™ (yellow)	C↓CGG	37°C
<i>AluI</i>	Y+/Tango™ (yellow)	AG↓CT	37°C

A PCR termékeket ezután *etanolos precipitációval* tisztítottuk meg. 0,5 ml-es steril Eppendorf csőbe a következőket mértük: 20 µl DNS, 3 µl nátrium-acetát (pH 4,6), 62,5 µl 96% etanol, 14,5 µl dH₂O, majd 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután 20 percig 14.000 g-n 4°C-on centrifugáltuk, majd a felülúszót pipettával eltávolítottuk. A pellethez 250 µl 70%-os etanolt adtunk, kémcső rázatón jól összekevertük. 14.000 g-n, 4°C-on, 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót pipettával óvatosan távolítottuk el. Majd a mintákat vákuumcentrifugába helyeztük 10 percre. A beszárított pelletet 30 µl vízben vettük fel.

A restrikciós enzimekkel emésztett, majd etanol precipitációval tisztított PCR termékeket kapilláris gélelektroforézissel választottuk el. A mintákat tesztcsövekben 12 µl formamiddal és 0,6 µl GeneScan™-500 TAMRA™ belső méret standarddal (Applied Biosystems) együtt denaturáltuk (98°C-on 5 percig). Ezután az elektroforézist ABI Prism™ 310 automata genetikai analizátoron (Applied Biosystems) végeztük 8 másodperces injektálás mellett 28 percen keresztül POP-4® polimeren (Applied Biosystems), 60°C-on és 15kV-on. A fluoreszcensen jelölt terminális fragmentumokat lézer detektálta. Az elektroferogramokat GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems) szoftver segítségével, Microsatellite módszerrel elemeztük.

A T-RF-ek beazonosítása céljából a J37/2 77. napi, a J10 76. napi és a J18/2 359. napi mintákból klónkönyvtárat készítettünk az Archaea diverzitás-vizsgálatok során, illetve a háromfázisú mikrokozmoszok kiindulási talajvízmintájából.

6.10.2. Bacteria közösség elemzés

A baktérium közösség szerkezetében időben bekövetkező változások vizsgálatára T-RFLP molekuláris ujjlenyomat módszert alkalmaztunk. Az elemzést az előzőekben leírtaknak (Révész és mtsai 2006) megfelelően végeztük el, azzal a különbséggel, hogy az amplifikáció során alkalmazott 27F primer 5'-Hexachloro-Fluorescein (HEX) jelölt volt és mind *AluI* (Fermentas), mind pedig *Bsh1236I* (Fermentas) restriktációs endonukleázt használtunk külön-külön az enzimatis emésztés során (5. táblázat).

5. táblázat. A Bacteria közösség T-RFLP elemzéséhez használt enzimek

Enzim	Puffer	Hasítási hely	Optimális hőfok
<i>AluI</i>	Y+/Tango™ (yellow)	AG↓CT	37°C
<i>Bsh1236I</i>	R+	CG↓CG	37°C

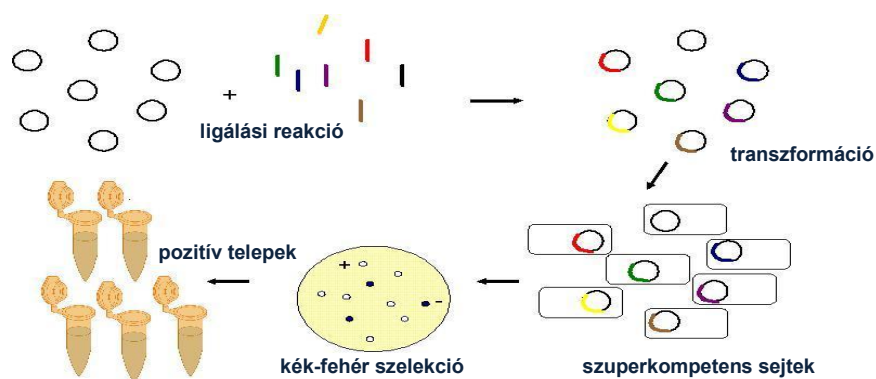
A T-RFLP elektroferogramokat a GeneMapper® v3.7 szoftverrel (Applied Biosystems) értékeltük ki. Kizárólag azokat a futásokat vettük figyelembe, ahol az összfluoreszcencia 150.000 és 300.000 relatív fluoreszcens egység közé esett. Az adatokat T-REX (T-RFLP Analysis Expedited) szoftverrel (Culman és mtsai 2009) dolgoztuk fel és elemeztük. Az adatok minőségi ellenőrzését az alábbi módon végeztük el: zajszűrés (csúcs területe, normál szórás szorzó =1) és T-RF illesztés (csoportosítási küszöbérték =0,5).

Az előzőekben leírtaknak megfelelően (Révész és mtsai 2006) a bakteriális közösségi ujjlenyomatban szereplő T-RF csúcsok pontos azonosításához 195 tagú klónkönyvtárat hoztuk létre a kiindulási talajvíz mintából pGEM-T Easy Vector System-et (Promega) használva. A klónok elsődleges csoportosítása az

AluI és a *Bsh1236I* (Fermentas) restriktációs enzimekkel történő emésztés után létrejött T-RF hosszakon alapult. Minden egyedi T-RFLP típusból egy képviselőt bázissorrend elemzésnek vetettünk alá (*Révész és mtsai 2006*), ehhez egy univerzális primert, az 534R primert (*Muyzer és mtsai 1993*) használtuk. A bázissorrend elemzésnek alávetett reprezentatív klónokhoz rendelhető TR-ek a teljes közösség összes csúcs alatti területének kb. 50%-át tették ki. A reprezentatív klónok bázissorrendjét a GenBank publikus szekvencia adatbázisban helyeztük el JQ436567 – JQ436579 közötti jelöléssel.

6.11. Klónkönyvtár létrehozása

Egy közösségből konszenzus primerekkel nyert PCR termék kevert, a fajmeghatározáshoz szükséges bázissorrend elemzéshez viszont egy fajból származó DNS kell, ezért szükség volt a kapott fragmentum keverék „szétválogatására” (13. ábra). A klónozást pGEM®-T Easy Vector Systemmel (Promega, Madison, WI, USA) végeztük (részletes leírást lásd a *Mellékletben*).



13. ábra. A klónkönyvtár létrehozásának sematikus ábrája.

A vektorba épített fragmentumokat PCR segítségével szaporítottuk M13f (5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3') és M13r (5' GGA AAC AGC TAT GAC CAT G 3'), vektorspecifikus primereket használva.

A reakció hőprofilja:

95°C	3 perc	
94°C	30 mp	}
52°C	30 mp	} 32 ciklus
72°C	1 perc	}
72°C	10 perc	
4°C	∞	Hűtés

Mivel egy fajból származó DNS több klónba is kerülhetett, szükség volt az azonos fragmentumot tartalmazó klónok megkülönböztetésére a drága és időigényes bázissorrend elemzés előtt. Az ARDRA (Amplifikált Riboszómális DNS Restriktációs Analízise) alkalmas az azonos inzertet tartalmazó klónok azonosítására. Az amplifikált 16S rDNS-t emésztjük többféle restriktációs endonukleázzal és a kapott fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel választjuk el egymástól. Az így kialakuló mintázat az eltérő fragmentumszám és méret miatt különféle lesz. Ennek alapján lehet a klónokat megkülönböztetni, illetve azonos csoportba sorolni.

Az alábbi reakcióelegyeket kevertük össze mintánként: 0,3 µl enzim (*AluI*), 2 µl puffer, 7,7 µl dH₂O és 10 µl PCR termék. Az elegyeket keverés után 37°C-os vízfürdőbe helyeztük 3,5 órára. Az emésztett PCR terméket 2 %-os agaróz gélben futtatuk 80V-on 1,5 órán át. A klónokat mintázati csoportokba soroltuk, a csoportreprezentáns klónokat bázissorrend meghatározásnak vetettük alá.

6.12. Bázissorrend elemzés

Steril PCR csövekben összemértünk 2 µl Ready Reaction Mix-et (Fermentas), 3 µl 5x puffert (Fermentas), 1µl 934r primert (Archaea esetében), illetve 534R primert (Bacteria esetében), 6 µl dH₂O-t és 8 µl tisztított PCR terméket és szekvenáló reakciót futtattunk.

A szekvenáló reakció hőprofilja:

96°C	10 mp	
50°C	5 mp	} 28 ciklus
60°C	4 perc	
4°C	∞	Hűtés

A termékeket ezután etanolos precipitációval tisztítottuk meg az előbbiekben leírtak szerint (6.10.1. fejezet, 65. oldal). A beszárított pelletet 20 µl formamidban vettük fel. Ezután 98°C-on 3 percig denaturáltuk. Majd a mintákat automata genetikai analizátorba (ABI Prism™ 310, Applied Biosystems) helyeztük és elektroforézist végeztük 45 másodperces injektálás mellett 120 percen keresztül POP-6® polimeren (Applied Biosystems), 15kV-on. Az adatgyűjtést és feldolgozást Sequence Analysis 4.3.1. szoftverrel automatikusan végeztük el.

6.13. Filogenetikai vizsgálatok

A számítógépes bázissorrend elemzés első lépéseként a kapott 16S rDNS szekvenciákat átfordítottuk 16S rRNS szekvenciákká, mivel az adatbázisokban is ilyen formában találhatók. Archaea-k esetében a taxonómiai besorolást illusztráló értékűnek fogtuk fel, a filogenetikai viszonyok pontos feltérképezése nem volt célunk.

A rokon taxonok szekvenciáit az RDP (Ribosomal Database Project) és az NCBI adatbázisból töltöttük le. Az így kapott szekvenciákat a saját klón szekvenciáinkkal ARB-SILVA (Quast és mtsai 2013) internetes programcsomag segítségével illesztettük, SINA illesztő programot (Pruesse és mtsai 2012) használva. A filogenetikai törzsfa szerkesztése MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programcsomag (Tamura és mtsai 2013) segítségével történt, Neighbor-Joining módszerrel (Saitou és Nei 1987), Maximum Composite Likelihood helyettesítési mátrix alkalmazásával, Kimura korrekcióval. Az elágazások megbízhatóságát 500 ismétléses bootstrap-tesztel ellenőriztük.

6.14. Statisztikai módszerek

Az Archaea diverzitás-vizsgálatok során a környezeti változók (kémiai paraméterek) és a T-RFLP eredmények közötti összefüggéseket többváltozós statisztikai módszerrel vizsgáltuk (Ramette 2007), ordinációs eljárást alkalmazva. Ennek lényege, hogy az eredeti sok dimenziót kevés számú dimenzióval helyettesítjük be. Ehhez olyan mesterséges változókat hozunk létre az eredeti adatstruktúra feltárására, amelyek a tényleges variancia minél nagyobb hányadát fedik le (Podani 1997). Feltételeztük, hogy a két változócsoporthoz (kémiai és biológiai eredmények) kapcsolata nem szimmetrikus, vagyis az Archaea közösség reagál a környezeti paraméterek változására, viszont ez visszafelé már nem (feltétlen) teljesül.

Az adatfeldolgozás során először a kémiai adatokat alakítottuk át. Erre azért volt szükség, mert a különböző kémiai paraméterek (pl. pH és TCE koncentráció) között jelentős nagyságrendbeli különbségek mutatkoztak és így az egyes változók eltérő mértékben járultak volna hozzá a végeredményhez. Az átalakításnál a *log transzformáció* módszerét (Podani 1997) alkalmaztuk a további elemzések normalitási feltételeinek kielégítésére, és mivel 0 értékek is megtalálhatók voltak az adattáblákban, ezért az alábbi kiegészített képlettel számoltunk:

$$x'_{ij} = \log_c (x_{ij} + 1)$$

ahol x'_{ij} az átalakított változó, x_{ij} az eredeti változó, c a logaritmus alapja, esetünkben 10. Jarque-Bera (1987) teszttel ellenőriztük az átalakított kémiai paraméterek normál eloszlását ($p > 0,05$ a normál eloszlás elfogadását jelenti). R program (R Development Core Team 2013) „vegan” (Oksanen és mtsai 2014) csomagjának Detrendált Korrespondencia Analízis (DCA) (Hill és Gauch 1980) parancsával azt vizsgáltuk, hogy adataink között lineáris vagy unimodális a kapcsolat. Az így feltárt gradiensek viszonylag hosszúnak adódtak (>4 érték), ezért feltételeztük, hogy a T-RFLP adatok változása unimodális (Leps és Smilauer 2003), így a kémiai változók biológiai paraméterekre gyakorolt hatását kanonikus korrespondencia elemzéssel (CCoA: Canonical Correspondence Analysis)

teszteltük. Az elemzést szintén az *R program „vegan”* csomagjának segítségével végeztük.

A legabundánsabb T-RF-ek megállapítására a „hő térkép” (heatmap) elemzést hívtuk segítségül. A hő térképek alkalmasak mátrix-szerűen rendezett nagy adathalmazok megjelenítésére. Biológiai értelemben, egy szokványos mátrixban az oszlopok adatokat tartalmaznak minden egyes mintára vonatkozóan, míg a sorok valamilyen tulajdonságnak feleltethetőek meg. A hő térkép kétféle hatást gyakorol a mátrixra: egyrészt újrendezi a sorokat és az oszlopokat olyan értelemben, hogy a hasonló profilú sorokat (és oszlopokat) összerendezi, jobban láthatóvá téve őket. Másrészt, az adatmátrix minden „tagja” színnel van jelölve, így lehetővé válik mintázatok megfigyelésére.

A háromfázisú mikrokozmoszok T-RFLP adatainak elemzéséhez a T-REX program által számolt mátrixot, ami a csúcs alatti területeken alapult, kétdimenziós *főkomponens elemzéshez* (PCA: *Principal Component Analysis*) használtuk fel PAST (Palaeontological Statistics Software Package) programban (Hammer és mtsai 2001).

VII. Eredmények és értékelésük

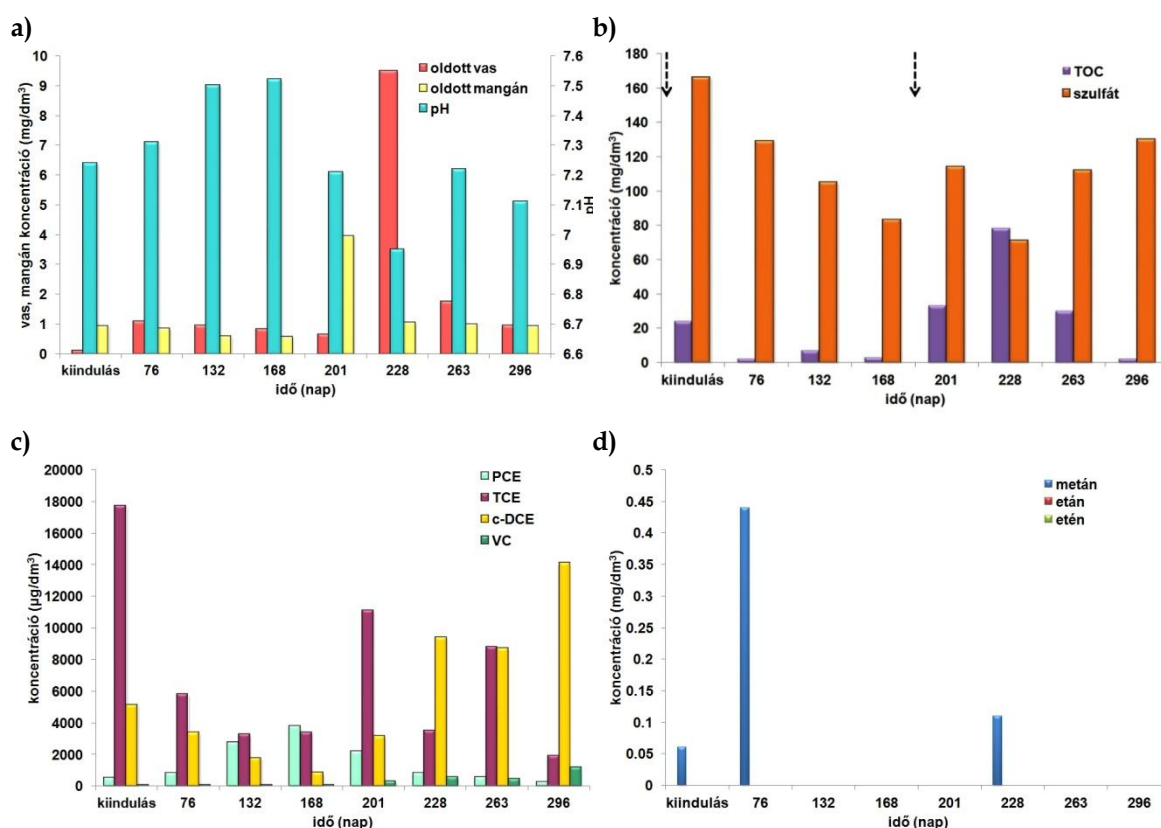
7.1. Az *in situ* biostimulációs beavatkozás és az Archaea diverzitás-vizsgálatok eredményei

7.1.1. Az *in situ* biostimulációs beavatkozás kémiai eredményei

A vízkémiai adatokból arra próbáltunk következtetni, hogy az adalékanyag hatására a vetélkedő mikrobák egyes csoportjainak hogyan változhat az aktivitása. A szulfát ionok csökkenése szulfátredukáló mikroszervezetek jelenlétére, az összes oldott vas és összes oldott mangán koncentrációjának növekedése pedig mikrobiális vas-, illetve mangánredukcióra utal. A TOC (Total Organic Carbon - összes szerves szén) mennyiségének változásával nyomon követhető a beadagolt szubsztrát megjelenésének és felhasználásának időbeli változása. A vízkémiai paraméterekkel párhuzamosan a szennyezők, illetve az oldott gázok koncentrációját is nyomon követtük. Ezekből az adatokból a dehalogenációs aktivitásra szeretnénk volna következtetni.

A TOC koncentrációjának változásával (14. b) ábra) nyomon követhető a beadagolt szubsztrát megjelenésének és felhasználásának időbeli változása. Jól látható a J10 kút esetében, hogy az első szubsztrát adagolás után folyamatosan csökkent a TOC koncentrációja egészen a második adagolásig (201. nap). A szerves szubsztrát második beinjektálásakor megnőtt a TOC koncentrációja, majd idővel folyamatosan ismét csökkent. Ezzel párhuzamosan a beadagolás hatására a pH is lecsökkent (14. a) ábra), ez valószínűleg az adalékanyagon, mint könnyen bontható szerves anyagon elszaporodó *fermentáló szervezetek* savtermelésének hatására történt. A 228. napon jelentős oldott vas koncentrációemelkedés látható (14. a) ábra), ami valószínűsíthetően nem az intenzív mikrobiális vasredukcióval magyarázható, hanem azzal, hogy a

beadagolt szubsztrát (tejipari savanyú savó) nagy mennyiségű vasat is tartalmazott. A szulfát koncentrációja fokozatosan csökkent a 201. napig (14. b) ábra), ami intenzív szulfátredukcióra utal. Ez több szempontból is fontos lehet a lebontás folyamatában. Egyrészt a szulfátredukáló szervezetek kompetítorai lehetnek a deklorinálóknak a hidrogénért folytatott versengésben, másrészt viszont kometabolikus folyamatok során részt is vehetnek a szennyezők lebontásában. A 228. naptól emelkedés látható a szulfát koncentrációban. A mangán koncentráció végig kicsi maradt.



14. ábra. A J10 kútból származó minták vízkémiai paramétereit (a és b), szennyezettségi adatait (c) és oldott gáz értékeit (d). Szaggatott nyilakkal jelöltük a szubsztrát betáplálásokat (b).

A J10 területen nem tapasztaltunk *etén* felszabadulást az utolsó mintavételi napig, a halogénezett szennyezők esetében viszont csökkenés figyelhető meg (14. c) ábra). A PCE koncentrációja az utolsó mintavételi időpontra határérték alá csökkent, a TCE koncentrációjában az első beadagolást

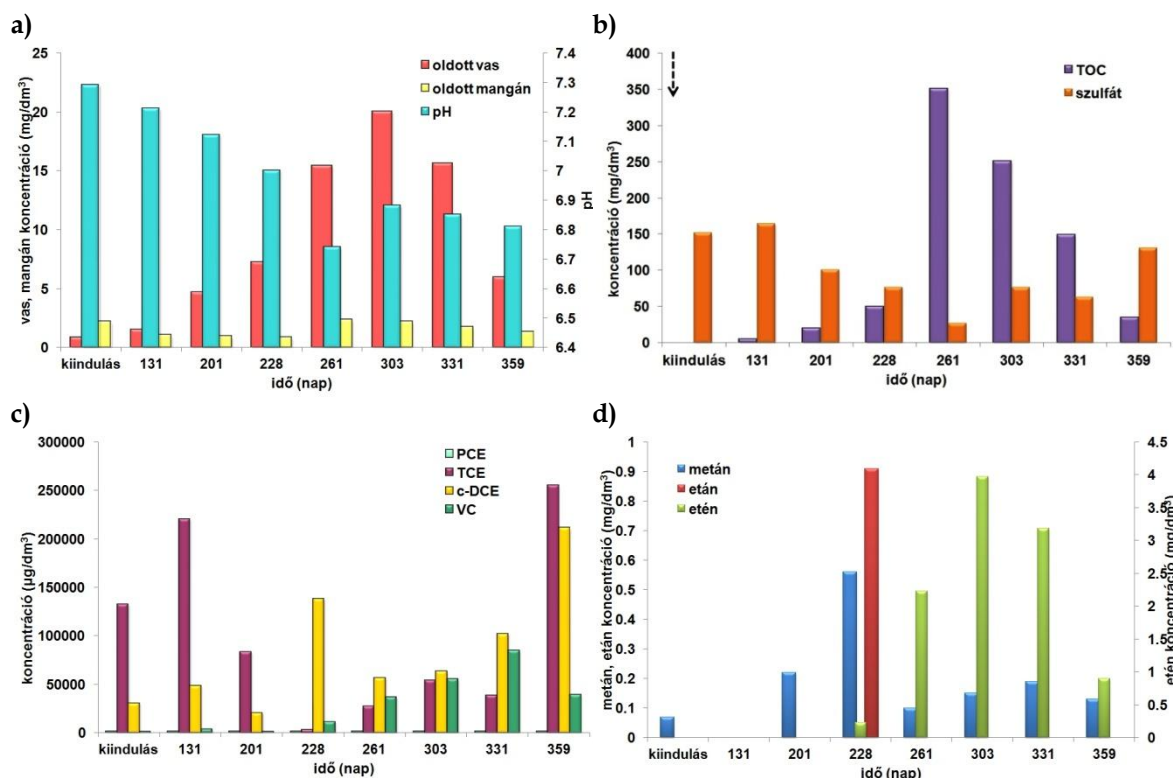
követően csökkenést tapasztaltunk, majd a szubsztrát elfogyásával (lásd TOC eredmények, 14. b) *ábra*) párhuzamosan növekedést. Az újbóli beadagolást követően ismét degradáció figyelhető meg. A TCE koncentrációjának csökkenésével párhuzamosan a *c*-DCE koncentrációja folyamatosan nőtt, az utolsó mintavételi időpontra pedig már VC is kimutatható volt (14. c) *ábra*). Az utolsó mintavételi napig azonban olyan kis koncentrációban szabadult fel a VC, hogy az abból keletkezett etén koncentrációja feltehetőleg kimutathatósági határérték alatt maradt (14. d) *ábra*).

Az első és a 168. mintavételi nap között növekedés figyelhető meg a PCE koncentrációjában. Ez valószínűsíthetően a talajmátrixból történő folyamatos szennyező anyag beoldódással magyarázható. *Chapman és mtsai (2005)* modellezték egy klórozott eténekekkel szennyezett területen a szennyezőanyag visszaoldódási folyamatokat és azt kapták eredményül, hogy az általuk vizsgált szennyezett területen a visszaoldódási folyamatok következtében akár évszázadok is eltelhetnek, mire a víztározó TCE koncentrációja eléri az 5 µg/l értéket (maximális szennyezési érték).

A TCE degradációval párhuzamosan a kiindulási, a 76. és a 228. napi mintákban metánt detektáltunk, ami metanogén szervezetek aktivitására (14. d) *ábra*) és esetleges kometabolikus dehalogenációs folyamatokra utalhat.

Ha a vízkémiai paramétereket a halogénezett szénhidrogén koncentrációkkal együtt vizsgáljuk, megfigyelhető, hogy a szubsztrát beadagolás hatására csökkenő szulfát koncentrációt és javuló bontási hatékonyságot tapasztalunk (14. b) és c) *ábra*). Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy **ha egy szennyezett területen nagy szulfát koncentrációt mérünk az előzetes vizsgálatok során, akkor valószínűleg többszöri szubsztrát beadagolással kell számolnunk az ideális bontási hatékonyság fenntartása érdekében.** Ezt a megállapításunkat korábbi mikrokozmosz kísérletek is igazolták (*Révész és mtsai 2006*).

A J18/2 kút esetében a második mintavételi időponttól folyamatosan csökkenő szulfát koncentrációkat mértünk (15. b) ábra), ami intenzív mikrobiális szulfátredukcióra utal. A TOC koncentráció változásán (15. b) ábra) látható, hogy csak több hónappal a szubsztrát adagolás után volt mérhető megnövekedett szerves anyag koncentráció (261. nap). A szennyezett terület ezen részére, 18 méteres mélységben tehát sokkal lassabb anyagáramlás volt jellemző, mint a másik két vizsgált területre/rétegre (lásd még az adagoló és monitoring kutak elhelyezkedését – 7. ábra). A TOC növekedéssel párhuzamosan növekvő *oldott vas* koncentrációt mértünk, ami a J10 kúthoz hasonlóan valószínűleg nem a mikrobiális aktivitással, inkább a beadagolt szubsztrát vastartalmával magyarázható. A *pH* az előzőleg leírtaknak megfelelően párhuzamosan csökkent a megnövekedett TOC és vas koncentrációval. A J10 kúthoz hasonlóan a J18/2 kút esetében is kis *mangán* koncentrációt mértünk az egész kísérlet során.

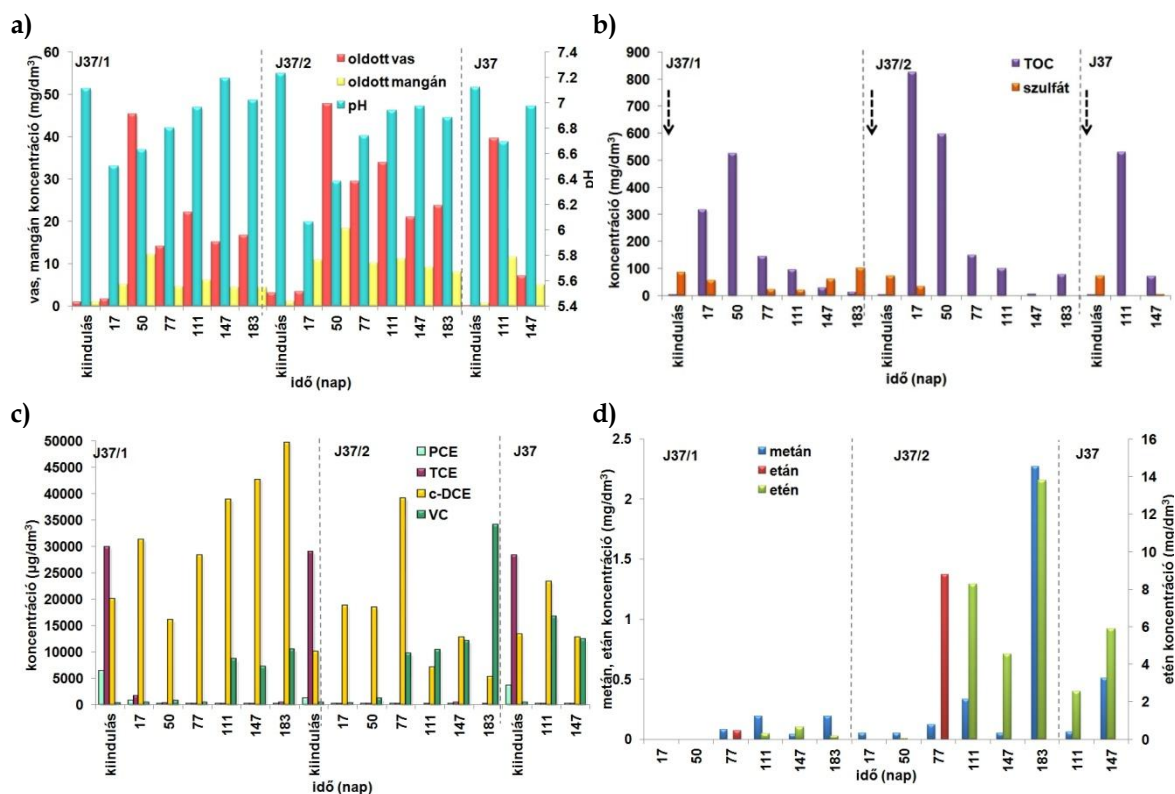


15. ábra. A J18/2 kút mintáinak vízkémiai paraméterei (a és b), szennyezettségi adatai (c) és oldott gáz értékei (d). Szaggatott nyíllal jelöltük a szubsztrát betáplálást (b).

A szennyezési paramétereket vizsgálva megállapíthatjuk, hogy a szubsztrát beadagolás hatására már a harmadik mintavételi időpontra határérték alá csökkent a PCE koncentrációja (15. c) ábra). A 228. napi mintavételre a TCE koncentrációja is jelentősen csökkent és ezzel párhuzamosan nőtt a c-DCE koncentrációja, megjelent a VC a rendszerben, illetve etén felszabadulást is ki tudtunk mutatni. Az ötödik mintavételi időponttól a TOC csökkenésével párhuzamosan ingadozást tapasztaltunk a szennyező anyagok koncentrációjában, csökkenő etén felszabadulás mellett. A közel egy éves kísérlet végére a TCE koncentrációja jelentősen megemelkedett, ami magyarázható lehet a beadagolt szerves anyag elfogyásával. Egy másik lehetséges magyarázat, hogy a talajvíz mozgásával szennyező anyag érkezhettek a szennyezési csóva más részeiből, illetve a reduktív deklorináció olyan megváltozott körülményeket idézhetett elő, amelyek befolyásolták a szennyezők koncentrációját. Például a PCE, TCE bontásából származó c-DCE oldószerként „viselkedve” előidézhette a TCE vizes fázisba való beoldódását.

A kísérlet végére azt a következtetést vontuk le, hogy **a beadagolt szerves anyag elfogyásával leromlik a degradációs potenciál, ezért ahhoz, hogy a megfelelő bontási hatékonyságot fenntartsuk, folyamatos, kis koncentrációjú szubsztrát beinjektálás javasolt.**

A J37 terület esetében a kiindulási mintavételt követően, a 111. napig kizárólag a két figyelő kutat mintáztuk, a J37 adagoló kutat csak később, amikor a figyelő kutakban már lecsökkent az összes szerves anyag koncentrációja, mert a szerves szubsztrát adagolás miatt nem kaptunk volna valós eredményeket. A 16. b) ábrán látható, hogy a beadagolt szerves anyag az áramlási iránnyal megegyező irányban elhelyezkedő kútban (J37/2) már a 17. mintavételi napon nagy koncentrációban megjelenik, míg az áramlási iránnyal ellentétesen elhelyezkedő kútnál (J37/1) a TOC koncentrációja az 50. napon tetőzött, de nem érte el a J37/2 kútban mért értéket.



16. ábra. A J37 területről származó minták vízkémiai paraméterei (a és b), szennyezettségi adatai (c) és oldott gáz értékei (d). Szaggatott nyilak jelölik a szubsztrát betáplálást (b).

A szubsztrát adagolás hatására erőteljes szulfátredukáló aktivitás volt megfigyelhető mind a két figyelő kút esetében (16. b ábra). Különbségeket tapasztaltunk a 77. naptól, amikortól az áramlási iránnyal ellentétesen elhelyezkedő kútban szulfát koncentráció növekedést tapasztaltunk, míg a J37/2 kút esetében ez nem volt megfigyelhető. Az oldott vas és mangán esetében hasonló trendet, viszont koncentrációbeli különbségeket tapasztaltunk a két figyelő kút között.

A szennyezőanyag koncentrációk adataiból (16. c ábra) az látszik, hogy a szubsztrát adagolás hatására mind a PCE, mind pedig a TCE koncentrációja határérték alá csökkent az 50. npra. A 77. mintavételi napon koncentrációnövekedést tapasztaltunk a c-DCE esetében a J37/2 kútban. Ez valószínűleg azzal van összefüggésben, hogy a J37/1 kútban erre az időpontra

a teljes TCE mennyisége átalakult c-DCE-né, aminek egy része a talajvízáramlás segítségével eljutott a J37/2 kútba. Ettől a mintavételi időponttól kezdődően a J37/1 kútban a halogénezett szénhidrogének koncentrációja nőtt, míg a J37/2 kútban csökkent. A J37/1 kút mintáiban a c-DCE koncentráció növekedésével párhuzamosan VC-t és *etént* is detektáltunk, ami arra utal, hogy a VC tovább bomlott klóratomokat nem tartalmazó terméké. A növekvő c-DCE koncentráció magyarázható lehet azzal, hogy a beadagolt szubsztrát ekkora elérhetett távolabb lévő területeket is, beindítva ott is a dehalogenáció folyamatát. Az így keletkezett c-DCE a talajvízáramlással jutott el a J37/1 kútba. A J37/2 kútba a talajvíz áramlási viszonyok következtében gyorsabban eljutott a beadagolt szubsztrát, emellett az ebbe a kútba eljutott talajvíz már kisebb koncentrációban tartalmazta a szennyezőket. Így a kútban csak átmenetileg, a 77. napra növekedett meg a c-DCE koncentrációja. VC-ot is ettől a mintavételi naptól detektáltunk. A 183. napi VC koncentráció növekedése valószínűleg azzal magyarázható, hogy ekkora nagy mennyiségű c-DCE tartalmú talajvíz jutott ebbe a kútba a J37/1 kútból. Etén felszabadulást mind a két figyelő kút esetében tapasztaltunk, viszont jelentős koncentrációbeli különbségeket figyeltünk meg.

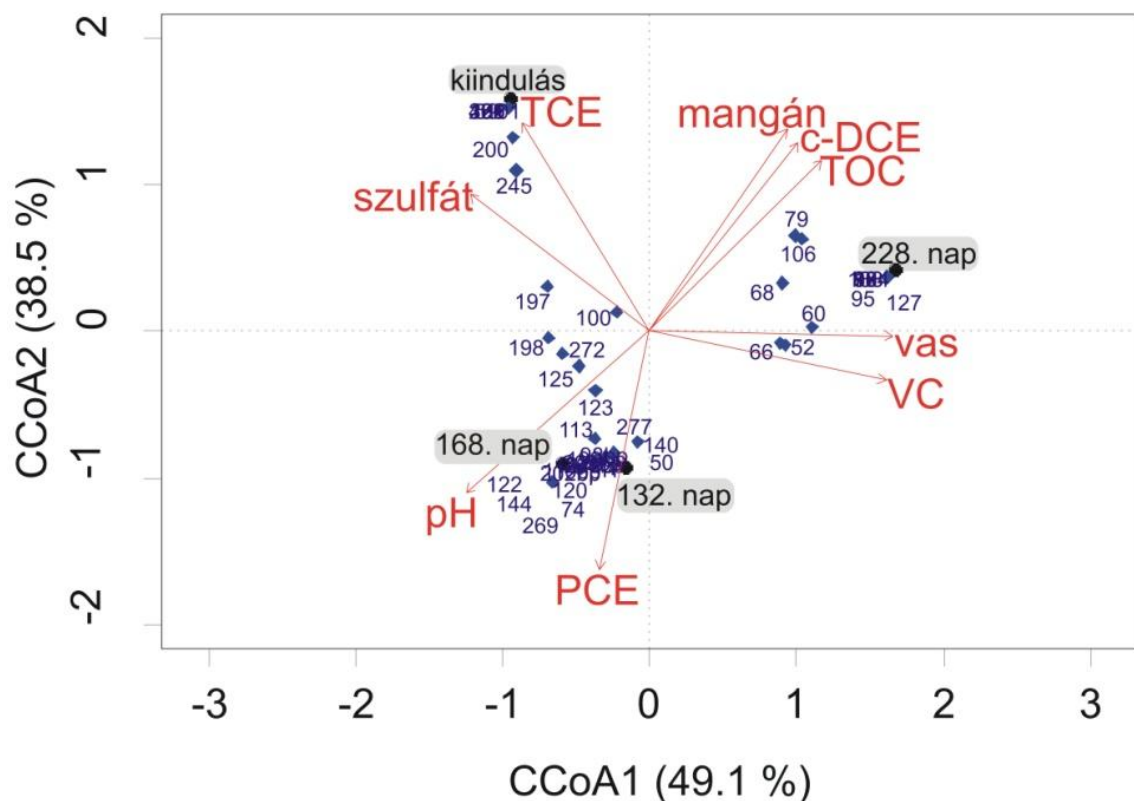
A J37 kút mintáinak kémiai elemzéséből láthatjuk, hogy **a nagy TOC és kis szulfát koncentráció kedvez a bontási potenciál növekedésének, míg a kis TOC és nagy szulfát koncentráció, ha nem is gátolja, de lényegesen lelassítja a szennyező anyagok bontását.** Az árokkút rendszer elhelyezkedéséből azt a következtetést is levonhatjuk, hogy **a két figyelő kút kémiai paramétereiben megmutatkozó különbségeket elsősorban a talajvíz áramlásának iránya határozta meg.** A J37/1 kútba folyamatosan nagy TCE koncentrációjú, szulfát ionokban gazdag talajvíz érkezett. Az adalékanyag hatására beindultak mikrobiológiai bontási folyamatok, csökkentve ezzel a szennyezők koncentrációját. Ezzel szemben a J37/2 kúthoz kisebb szennyezőanyag koncentrációjú talajvíz áramlott.

7.1.2. Az Archaea diverzitás-vizsgálatok biológiai eredményei

A biológiai elemzés során az Archaea közösségek változását molekuláris ujjlenyomat módszerrel (T-RFLP) vizsgáltuk. Az egyes minták eltérő paraméterekkel történő elektroforézise után kiválasztottuk a megfelelő futásokat, zajsűrés hajtottunk végre, így a futások illesztését T-REX programmal (Culman és mtsai 2009) végeztük. A kapott mátrixot statisztikai elemzéshez használtuk fel. Többváltozós statisztikai módszereket alkalmaztunk a környezeti változók és a biológiai paraméterek közötti összefüggések feltárására. Egyrészt arra a kérdésre kerestük a választ, hogy mely kémiai paraméterek befolyásolják az egyes minták (időpontok) „elválását”, illetve hasonlóságát a szennyezett terület különböző mélységeiben, illetve különböző koncentrációjú szennyezők esetén. Másrészt, mivel minden T-RF-hez (elméletben) egy OTU (Operational Taxonomic Unit - taxonómiai egység) rendelhető, ami egy különálló taxont határoz meg, azt próbáltuk felderíteni, hogy a szennyezettségi paraméterek hogyan befolyásolják egyes fajok illetve mikroba csoportok jelenlétét vagy hiányát.

Minden minta esetében számoltunk diverzitás indexeket (20. ábra), mivel a nagyon kis, illetve nagyon nagy Shannon-diverzitású minták torzíthatják az ordinációt (Vajna 2010).

A J10 kút Archaea T-RFLP mintázatának környezeti változókkal való kapcsolatát *kanonikus korrespondencia elemzéssel* vizsgáltuk, amely szerint az első tengely a variancia 49,1%-át magyarázta meg, a második tengely pedig 38,5%-át (17. ábra). Látható, hogy a négy szennyező (PCE, TCE, c-DCE, VC) jól elválík egymástól, ezért könnyen meghatározható, hogy melyik szennyező korrelál az egyes T-RF-ekkel.

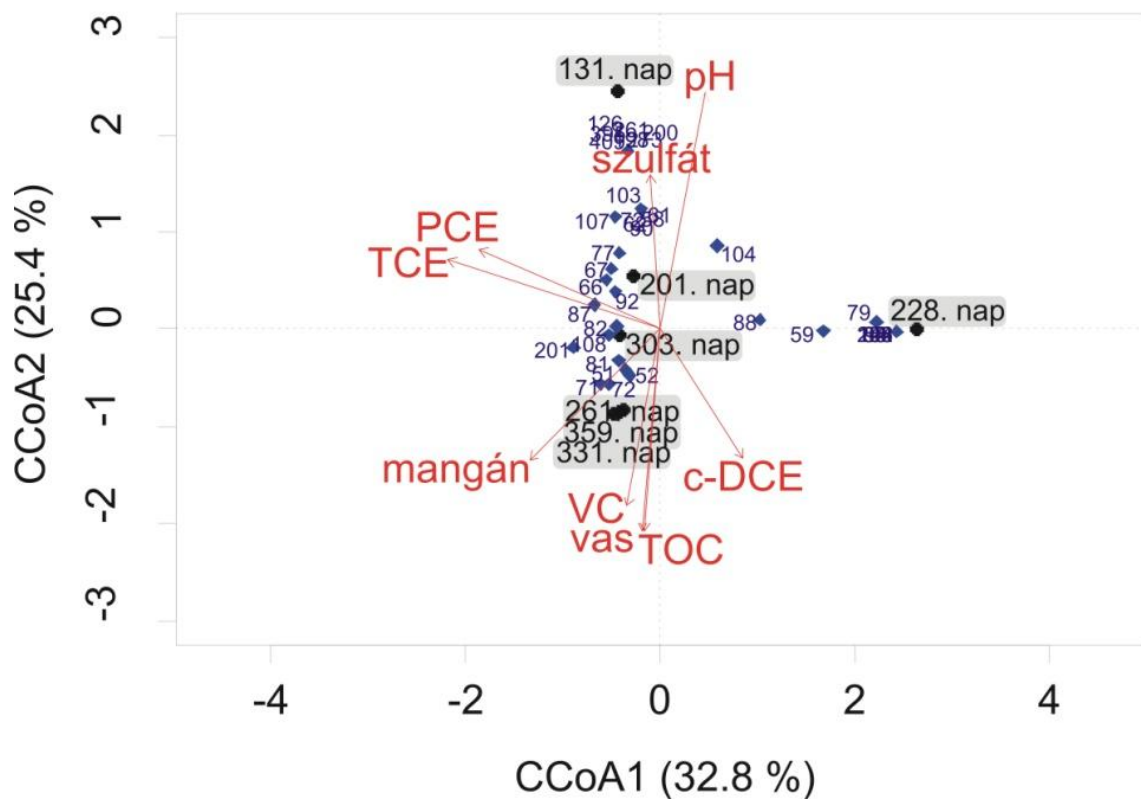


17. ábra. A J10 kút T-RFLP mintázatainak (*Msp*I endonukleázzal való emésztés után) összevetése a kémiai eredményekkel kanonikus korreszpondencia elemzéssel (CCoA). Piros színnel jelöltük az egyes kémiai paramétereket, feketével a mintavételi napokat és kékkel a T-RF csúcsoakat.

Mindamellett a *biplot funkció* segítségével láthatóvá válik, hogy az egyes minták elválását minden esetben egy szennyező és (legalább) egy vízkémiai paraméter együttesen okozzák. Így a kiindulási minta elválását a TCE és a szulfát, a 132. és 168. napi mintáét a pH és a PCE, míg a 228. napi mintáét a mangán, a vas, a TOC, a c-DCE és a VC koncentrációja együttesen határozza meg. *Korrelációs analízist és hőtérkép vizsgálatot (lásd Melléklet 1. ábra)* végeztünk a T-RF-ek relatív abundancia értékeit és a kémiai változókat összehasonlítva annak felderítésére, hogy egy bizonyos abundáns T-RF/OTU időbeli megjelenése összefüggésbe hozható-e egy bizonyos környezeti paraméter

változásával. A hőtérkép vizsgálat szükséges volt ahhoz, hogy megjelenítsük, mely T-RF-ek voltak a legabundánsabbak a különböző mintákban. A korrelációs vizsgálatokból megállapítottuk, hogy a legabundánsabb T-RF-ek korreláltak egy vagy néhány jellemző kémiai paraméterrel. Úgy, mint az 52-es, a 60-as, 66-os és a 68-as csúcsok pozitív korrelációt mutattak a VC és a vas koncentrációval, míg a 68-as csúcs negatívan korrelált a pH-val. A 200-as és a 245-ös csúcs a TCE és a szulfát koncentrációval korrelált pozitívan. A 113-as és a 123-as csúcs pozitívan korrelált a pH-val, a PCE koncentrációval és negatívan a TOC, a mangán és a c-DCE koncentrációval. A 79-es és a 106-os csúcs pozitívan korrelált a VC, a vas és a TOC koncentrációval és negatívan korrelált a pH-val. Ezen csúcsok közül klónkönyvtár készítéssel és bázissorrend elemzéssel csupán az 52-es (10/10 klón) és a 200-as (10/5 klón) csúcsokat sikerült azonosítanunk.

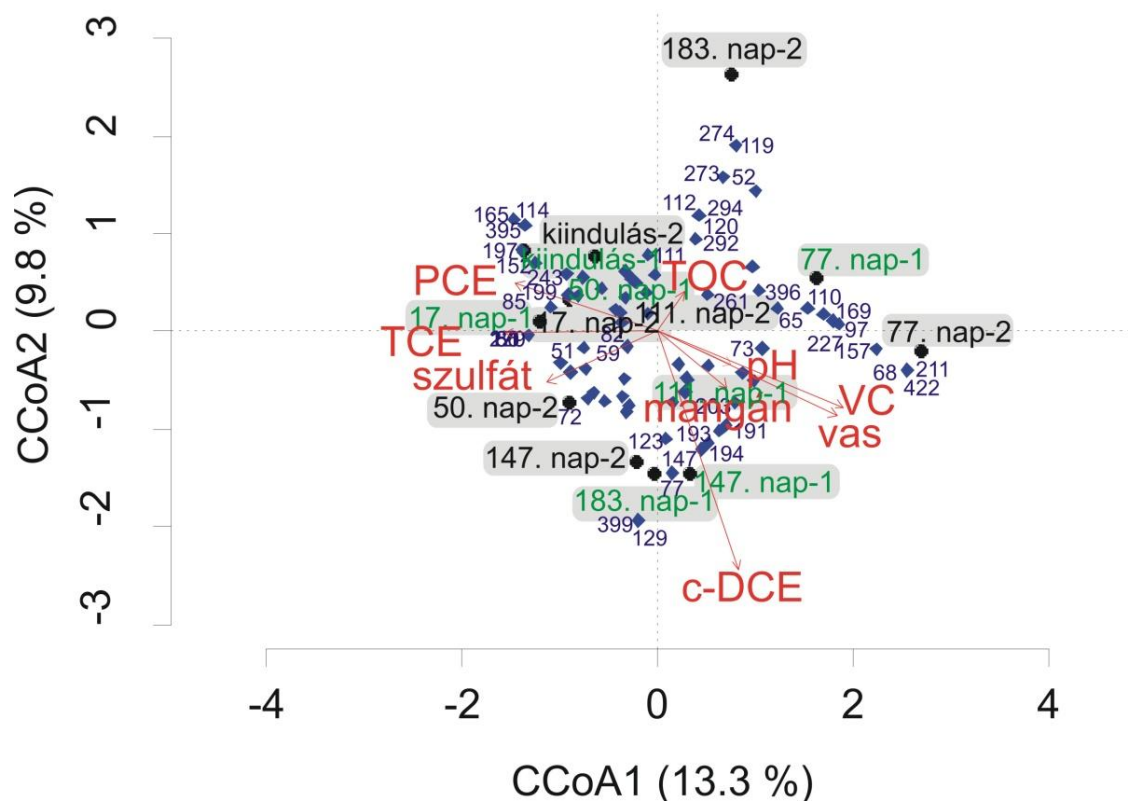
A J18/2 kút Archaea T-RFLP mintázatának környezeti változókkal való kapcsolatát szintén *kanonikus korrespondencia elemzéssel* vizsgáltuk, amely szerint az első tengely a variancia 32,8%-át magyarázza meg, a második tengely pedig 25,4%-át (18. ábra). A többszörösen klórozott szénhidrogének és a kevésbé klórozott szénhidrogének közötti elválást a második tengely, míg a VC és c-DCE közötti elválást az első tengely határozta meg. A 131. nap elválását a többi időpont mintáiból a pH és a szulfát koncentráció, míg a 261., a 331. és a 359. nap elválását a mangán, a vas, a TOC, a c-DCE és a VC koncentráció együttesen határozta meg. Hőtérkép elemzéssel megkerestük a legabundánsabb T-RF-eket (OTU-kat). A korrelációs vizsgálatokból megállapítottuk, hogy az 59-es, 79-es és a 88-as csúcs negatívan korreláltak a TCE és a PCE koncentrációval. Az 52-es csúcs pozitívan korrelált a VC és a mangán koncentrációval és negatívan korrelált a pH-val. A 71-es, 72-es és a 81-es csúcsok pozitívan korreláltak a vas, a mangán és a TOC és negatívan a szulfát koncentrációval. A 82-es és 92-es csúcsok negatívan korreláltak a c-DCE koncentrációval. A klónkönyvtár elemzés és bázissorrend elemzés során csupán a 107-es (18/2-23) csúcsot sikerült azonosítanunk.



18. ábra. A J18/2 kút T-RFLP mintázatainak (*Msp*I endonukleázzal való emésztés után) összevetése a kémiai paraméterekkel kanonikus korrespondencia elemzéssel (CCoA). Piros színnel jelöltük az egyes kémiai paramétereket, feketével a mintavételi napokat és kézzel a T-RF csúcsokat.

A J37 kút Archaea T-RFLP mintázatának környezeti változókkal való kapcsolatát ugyancsak *kanonikus korrespondencia elemzéssel* vizsgáltuk, amely szerint az első tengely a variancia 13,3%-át magyarázza meg, a második tengely pedig 9,8%-át (19. ábra). Látható, hogy növekvő adatszámnál (J10 → 4 minta, J18/2 → 7 minta és J37 → 14 minta) a két tengely együttesen a variancia egyre kisebb százalékát határozza meg. Ezt fontos figyelembe vennünk egy nagy mintaszámmal járó hosszabb *in situ* beavatkozás eredményeinek elemzése során. A többszörösen klórozott szénhidrogének és a kevésbé klórozott szénhidrogének közötti elválást az első tengely határozta meg. A 19. ábráról leolvasható, hogy a két monitoring kút esetében az első három időpontban vett

minta együtt csoportosul, elválásukat a többi mintától a PCE, TCE és szulfát együttesen határozta meg. A többi minta elválását a J37/2 kút 183. napi mintájának kivételével, a c-DCE, VC, pH, vas és mangán koncentráció határozza meg.



19. ábra. A J37/1 és J37/2 kút T-RFLP mintázatainak (MspI endonukleázzal való emésztés után) összevetése a kémiai paraméterekkel kanonikus korrespondencia elemzéssel (CCoA). Piros színnel jelöltük az egyes kémiai paramétereket, zölddel (J37/1) és feketével (J37/2) a mintavételi napokat és késsel a T-RF csúcsokat.

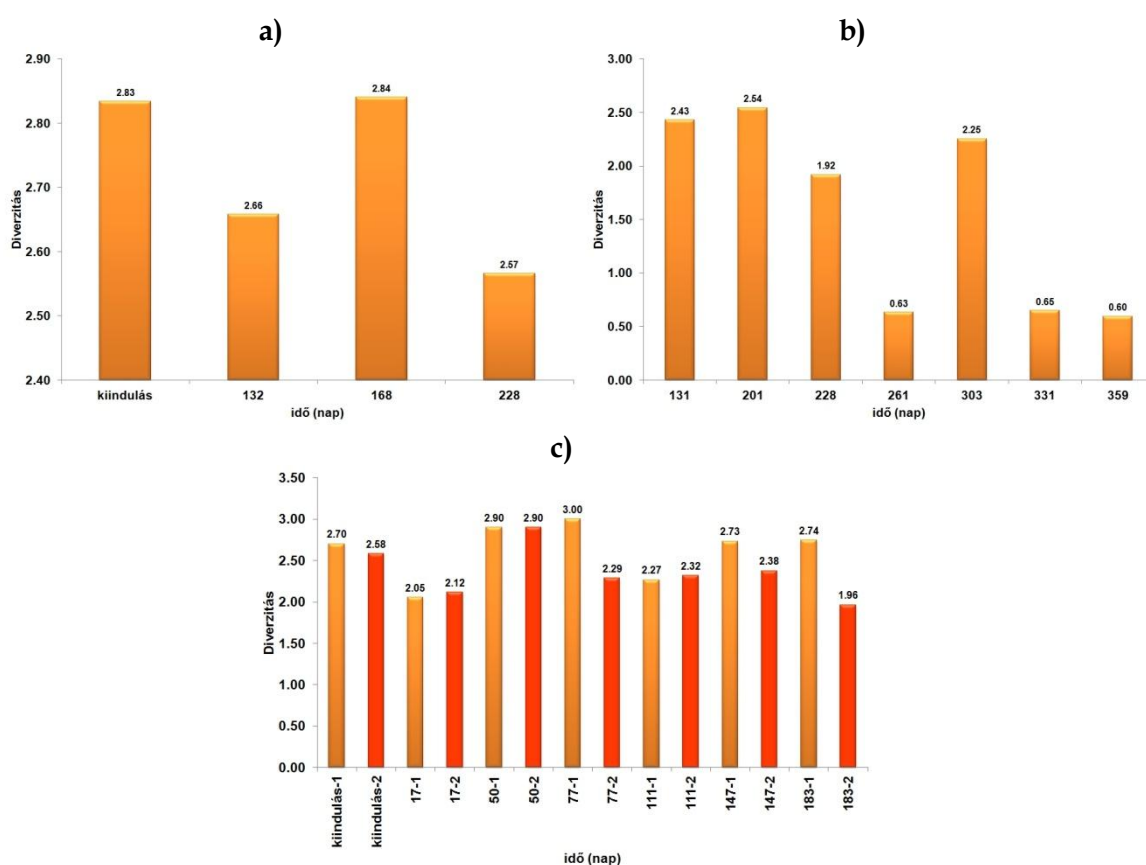
Korrelációs vizsgálatokat végeztünk a J37-es mintáknál is a legabundánsabb T-RF-ek/OTU-k és a kémiai paraméterek közötti összefüggések felderítésére. Az 51-es, 199-es, 243-es és a 245-ös csúcsok negatívan korreláltak a VC és a vas koncentrációjával. A 107-es, 148-as, 197-es, 199-es, 245-ös, 249-es és a 277-es csúcsok pozitívan korreláltak a PCE és a TCE

koncentrációjával. A 126-os, 147-es és 203-as csúcsok pozitívan, míg a 273-as csúcs negatívan korrelált a TCE koncentrációjával. Bázissorrend elemzéssel a klónkönyvtárból a 199-es (37/2-5), a 249-es (37/2-6) és a 277-es (37/2-9) csúcsokat sikerült azonosítanunk.

A kanonikus korrespondencia elemzésekből kitűnik egyrészt, hogy a TCE és a szulfát, a VC és a vas, illetve a c-DCE és a mangán paraméterek együttesen befolyásolták a minták elválását. A különböző mintavételi helyek vizsgálatából pedig az látható, hogy bizonyos T-RF-ek/OTU-k minden mintában abundánsnak bizonyultak és erősen korreláltak bizonyos szennyezőkkel, míg mások terület specifikusak. Az 52-es T-RF (illetve a neki megfeleltethető taxonómiai egység, lásd 21. ábra, 10/10-es klón), minden területen abundánsnak bizonyult és szoros korrelációt mutatott a VC koncentrációval, míg a 245-ös T-RF/OTU (21. ábra 18/2-2 klón), ami szintén minden mintában nagy abundanciával fordult elő, a TCE koncentrációval mutatott szoros összefüggést. A három terület T-RFLP mintázatának összegzéséből az látszik, hogy az 52-es, 60-as, 66-os, 68-as, 76-os és 106-os csúcsok valószínűsíthetően olyan taxonómiai egységeknek voltak megfeleltethetők, amelyek jól tolerálják a nagy VC koncentrációt, és akár annak lebontásában is részt vehetnek, illetve kometabolikus folyamatok során segíthetik a dehalogénező baktériumokat. A 126-os, 200-as és a 245-ös csúcsok olyan Archaea-knak voltak megfeleltethetők, amelyek tolerálják a nagy TCE koncentrációt, viszont ahogy az egyes mintákban csökkent a TCE koncentrációja, ezek a csúcsok már nem voltak detektálhatóak. A c-DCE szennyezéssel mutatott szoros korrelációt a 82-es és a 92-es csúcs, amelyek kizárólag a J18/2 mintában fordultak elő. A J37-es mintákban számos olyan OTU-t figyelhattunk meg, amelyek csak ezen terület mintáiban voltak jelen és szoros összefüggést mutattak a PCE és TCE koncentrációval.

A Shannon-féle diverzitás indexek vizsgálatával arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a szennyezési paraméterek változása hogyan

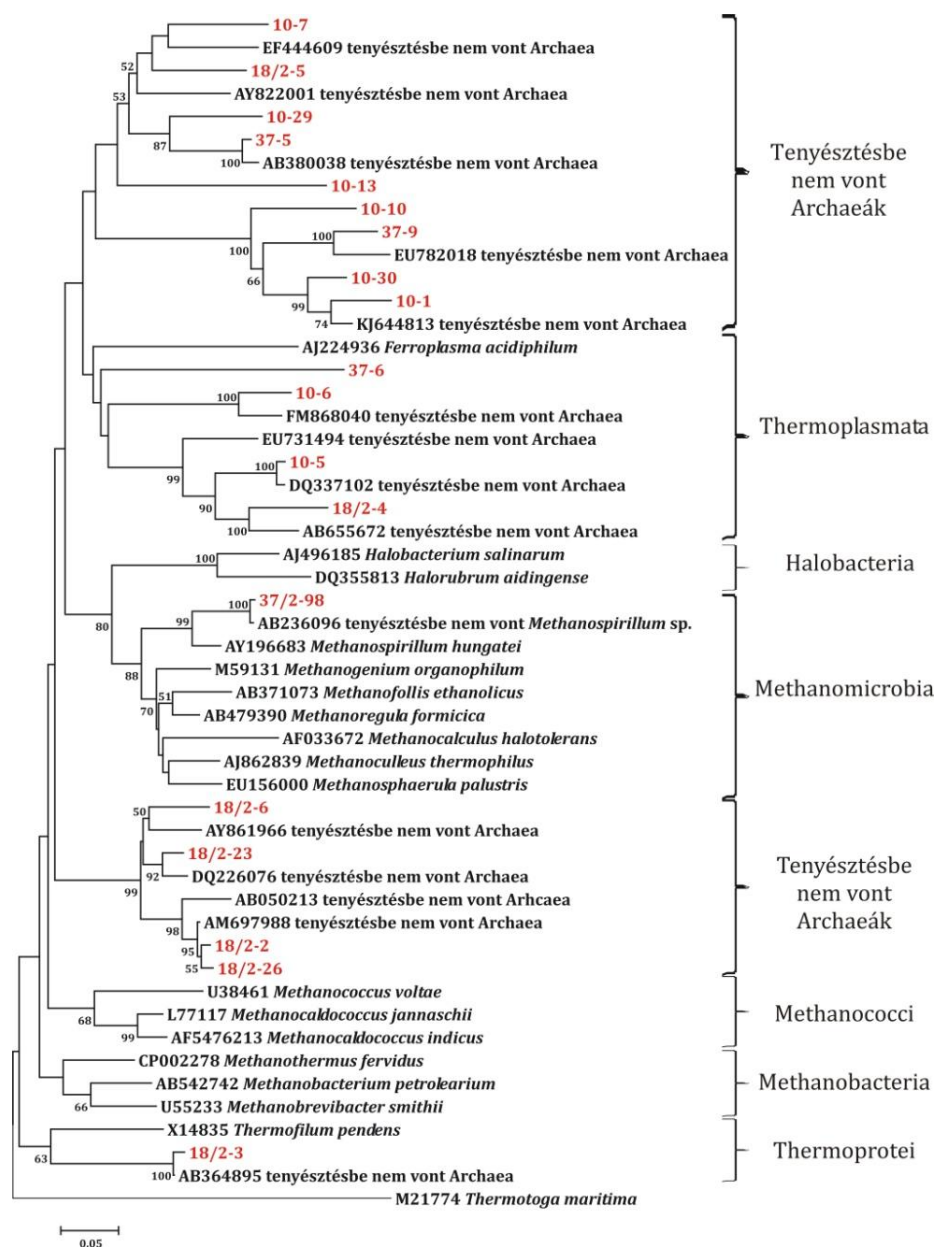
befolyásolja az Archaea közösség diverzitását, vagyis a taxonómiai csoportok sokféleségét. A 20. ábrán látható, hogy jelentősebb diverzitásbeli különbségeket kizárólag a J18/2 minta esetében figyeltünk meg. A 261., a 331. és a 359. napi minták Archaea diverzitása jelentősen lecsökkent, ami a második adagolás hatására nagymértékben megváltozott kémiai értékekkel (oldott vas, TOC, TCE, c-DCE koncentráció) magyarázható.



20. ábra. T-RFLP mintázatokból számolt Shannon-diverzitás. a) J10, b) J18/2, c) J37 minták.

Archaea klónjaink és a hozzájuk legközelebbi rokon szervezetek 16S rRNS szekvenciáiból filogenetikai fát készítettünk (21. ábra). **Klóncsoportjaink legközelebbi rokonai a Thermoplasmata (37-6, 10-6, 10-5, 18/2-4), Methanomicrobia (37/2-98) és a Thermoprotei (18/2-3) osztályba tartoztak.** A Methanomicrobia csoportot Duhamel és munkatársai (2004) mutatták ki

deklorináló közösségben. Olyan csoportok is közel találhatóak a filogenetikai fán klóncsoportjainkhoz, amelyek tenyésztésbe nem vont szervezetek, többségüket szennyezett területekről írták le (10-7, 18/2-5, 10-29, 37-5, 10-13, 10-10, 37-9, 10-30, 10-1, 18/2-6, 18/2-23, 18/2-2 és 18/2-26).



21. ábra. A MEGA programcsomag segítségével a részleges 16S rRNS gén szekvenciák alapján szerkesztett törzsfá (Neighbor-Joining módszerrel, Maximum Composite Likelihood helyettesítési mátrix alkalmazásával, az elágazások megbízhatóságát 500 ismétléses bootstrap-tesztel ellenőriztük).

Mivel a klónszekvenciák bázissorrend elemzésével sem tudtunk pontos fajazonosítási eredményhez jutni, ezért elvégeztük az Archaea adatbázis *in silico* T-RFLP vizsgálatát MICA 3 (Microbial Community Analysis III, Shyu és mtsai 2007) programmal. A molekuláris vizsgálatok során alkalmazott primereket és restriktációs enzimeket alkalmaztuk (6.10.1. fejezet). Sajnos ezzel a módszerrel sem tudtuk beazonosítani az egyes T-RF-eket. Többnyire tenyésztésbe nem vont klónokat kaptunk eredményül a 126 bp-os és a 200 bp-os T-RF-ek kivételével. Előbbit *Methanobrevibacter* sp.-ként, utóbbit *Termoplasmata* csoportba tartozó mikrobaként azonosította be a program.

7.2. A *Dehalococcoides* diverzitás-vizsgálatok eredményei

7.2.1. 16S rRNS *Dehalococcoides* sp. gének

Taxon-specifikus 16S rRNS-alapú PCR amplifikációt végeztünk a *Dehalococcoides* nemzetség detektálására. A nested PCR amplifikáció 438 bp hosszúságú terméket eredményezett minden esetben, bizonyítva ezzel a *Dehalococcoides* spp. jelenlétét minden mintában (6. táblázat).

7.2.2. Direkt szekvenálás

Mivel egy korábbi tanulmány a klónozás, újra amplifikálás és bázissorrend meghatározás módszer következtében létrejött, ritka, 1-2 bp-nyi változást mutatott a *Dehalococcoides* típus szekvenciákban (Cichocka és mtsai 2010), ezért a *Dehalococcoides* sp. diverzitását egy új direkt bázissorrend meghatározási módszerrel állapítottuk meg. Ezzel a módszerrel képesek voltunk különbséget tenni az alkalmazott molekuláris biológiai technikák okozta torzítás és a valódi szekvencia variánsok között, továbbá gyorsan és egyértelműen azonosítottuk a jelenlévő alcsoportokat. A direkt bázissorrend meghatározási eljárást ismert koncentrációjú PCR termékek különböző arányú keverékével teszteltük. A DNS arányok, amelyeknél még meg tudtuk különböztetni a Cornell és Pinellas *Dehalococcoides* alcsoportokat, 1:5 és 1:50

közé estek (lásd 12. ábra). Az 1:5 aránynál a kevésbé jelentős (*minor*) és a túlsúlyban lévő szekvencia variánsokat is meg tudtuk különböztetni. Ezzel szemben 1:50 aránynál ugyan még láthatóak voltak a kevésbé jelentős (*minor*) szekvencia variánsok, de a csúcsok nagysága a zajszint tartományába esett. Ezen módszer alapján az összes szekvencia, a talajvízből, a mesterséges lápból, a mikrokozmoszokból és a dúsító kultúrák mintáiból származók is, a Pinellas alcsoportba tartozott.

A filogenetikai elemzés feltárta, hogy az összes kinyert bázissorrend azonos volt (100% szekvencia hasonlóság) a *Dehalococcoides mccartyi* GT, FL2, BAV1 és CBDB1 törzsekével (6. táblázat). Mivel minden bázissorrend azonos volt, ezért csak a leghosszabbat helyeztük el az EMBL publikus adatbázisban, HE651153 azonosító számmal. Ez a szekvencia azonos volt a korábban a Bitterfeld talajvízből (AM399022) és a BTF08 dúsító kultúrából (AM981291) kinyert szekvenciákkal. Ez a megfigyelés azt sejteti, hogy – 16S rRNS gén szekvencia alapon – csak egy *Dehalococcoides* sp. van jelen a Bitterfeld régióban és hogy a forrásmintában túlsúlyban lévő mikroorganizmusok típusa, amelyeket újabb és újabb dúsítással tartottunk fenn, független a különböző kémiai körülményektől (szennyezés, geokémiai paraméterek, úgy, mint elektródpotenciál, TOC, pH és elektron donor).

Eredményeink arra is rávilágítanak, hogy a **taxon-specifikus, vagy gén-specifikus PCR direkt bázissorrend meghatározással megfelelő információt nyújthat, ha egy adott taxon vagy specifikus gén variáns domináns a kisebb abundanciájú populációval szemben, ami kevesebb, mint 2%-ban van jelen.** Mindazonáltal, „kétértelmű”/”nem tiszta” szekvenciák bizonyos esetekben azt sejtetik, hogy kevert mikroba közösséggel van dolgunk, ami klónozást tesz szükségessé annak érdekében, hogy helyesen tudjuk azonosítani a kevert szekvenciát mutató mikroorganizmusokat vagy gént.

6. táblázat. A minták, a hidrokémiai és a szennyezettségi adatok, illetve a *Dehalococcoides* és funkciógén specifikus PCR kimutatások eredményének összegzése. Eh=redox potenciál (mV), TOC=összes szerves szén (mg/l), P=PCE, T=TCE, D=DCE, V=VC, E=etén; DHC=*Dehalococcoides* sp., p=Pinellas, c=Connell alcsoport, X jelöli az előfordulást, a jelöli a hiányt, n.d. jelöli, ha a gént nem tudtuk kimutatni és - jelöli, ha a megfelelő adat nem elérhető vagy nem lényeges. (x) jelöli, ha néhány dúsító kultúrához PCE-t adagoltak és TCE, DCE jelent meg, mint bomlástermék.

	Eredet (lásd 8.ábra)	Hidrokémia			Klórozott etének					DHC Dehalogenázok			A legközelebbi dehalogenáz rokon		
		Eh	pH	TOC	P	T	D	V	E	(p/c)	tceA	bvcA	vcrA	bvcA (bp)	vcrA (bp)
Talajvíz	1241 (csóva forrás)	-123	4.8	-	X	X	X	X	X	p	n.d	n.d	X	-	<i>Dehalococcoides</i> sp. GT (100 %) CP001924 (144)
	3051 (csóva közepe)	-272	6.4	-	a	X	X	X	X	p	n.d	n.d	X	-	<i>Dehalococcoides</i> sp. GT (100 %) CP001924 (375)
	3062 (csóva szegély)	-412	6.7	-	X	X	X	X	X	p	n.d	n.d	n.d	-	
	ML-d7 (többszintű kút, 36.5 mbS)	11	5.8	<5	X	X	X	X	X	p	n.d	n.d	X	-	<i>Dehalococcoides</i> sp. GT (100 %) CP001924 (149)
	ML-d4 (többszintű kút, 19.5 mbS)	30	5.7	<5	a	X	X	a	a	p	n.d	n.d	n.d	-	
	BMH	327	6.7	15.6	X	X	X	X	X	p	n.d	n.d	n.d	-	
Mesterséges láp	BMH-WL (vízminták a c- és t-DCE szennyezett mesterséges lápból)	-137	6.9	35.9	a	a	X	X	X	p	n.d	X	X	<i>Dehalococcoides</i> sp. BAV1 (100 %) CP000688 (460)	<i>Dehalococcoides</i> sp. GT (100 %) CP001924 (340)
Mikrokozmoszok	588/589-1 (talajvíz+ 3mM laktát és VC)	-	-	-	a	a	a	X	X	p	n.d	X	X	<i>Dehalococcoides</i> sp. BAV1 (98) CP000688 (721)	<i>Dehalococcoides</i> sp. GT (100%) CP001924 (390)
	588/589-2 (talajvíz + 3mM laktát és t-DCE)	-	-	-	a	a	X	X	X	p	n.d	n.d	X	<i>Dehalococcoides</i> sp. GT (100%) CP001924 (350)	
	5261 (talajvíz + 3mM laktát és VC)	-	-	-	a	a	a	X	X	p	n.d	n.d	X	<i>Dehalococcoides</i> sp. GT (100%) CP001924 (377)	
	3051-1 (talajvíz + 3mM laktát és VC)	-	-	-	a	a	a	X	X	p	n.d	X	X	<i>Dehalococcoides</i> sp. BAV1 (97) CP000688 (422)	<i>Dehalococcoides</i> sp. GT (100%) CP001924 (377)
	3051-2 (dúsított DHC kultúra + H ₂ +acetát/laktát és VC/PCE)	-	-	-	(x)	(x)	(x)	X	X	p	n.d	n.d	X	<i>Dehalococcoides</i> sp. GT (100%) CP001924 (376)	
	<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	<i>Magnuson és mtsai 2000</i>									X	n.d	n.d		
Hivatkozott törzsek	<i>Dehalococcoides</i> sp. FL2	<i>He és mtsai 2005</i>									X	n.d	n.d		
	<i>Dehalococcoides</i> sp. BAV1	<i>Krajmalnik-Brown és mtsai 2004</i>									n.d	X	n.d		
	<i>Dehalococcoides</i> sp. GT	<i>Sung és mtsai 2006</i>									n.d	n.d	X		
	<i>Dehalococcoides</i> sp. VS	<i>Müller és mtsai 2004</i>									n.d	n.d	X		

Míg a specifikus 16S rRNS-t célzó PCR és a későbbi bázissorrend meghatározás igazolta a *Dehalococcoides*-ek jelenlétét, általuk nem kaptunk információt a dehalogenációs potenciálról és a szubsztrát specifitásról. Ezért, megvizsgáltuk a specifikus RDáz gének jelenlétét is, annak érdekében, hogy jobban meg tudjuk becsülni a *Dehalococcoides* populáció lebontó potenciálját.

7.2.3. RDáz gének

A TCE RDáz (*tceA*) és a VC RDáz (*vcrA*, *bvcA*) gének jelenlétét és filogenetikáját specifikus PCR-rel is megvizsgáltuk, és bázissorrendjüket meghatároztuk, hiszen eténig történő reduktív deklorináció zajlott a vizsgált rendszerekben. A szekvenciákat az EMBL publikus adatbázisban helyeztük el HE653967-től HE653970-ig azonosító számmal.

7.2.3.1. A *tceA* gén

A *tceA* specifikus PCR próba nem eredményezett detektálható amplikont, annak ellenére, hogy nagy TCE koncentrációk (11,6-35 mg/l) és deklorinációs termékek (DCE, VC és etén) együttes jelenlétét detektáltuk az 1241-es számú kútból származó talajvízmintákban (15,9 mg/l c-DCE, 4 mg/l VC és 0,5 mg/l etén) (Melléklet 2. táblázat). Továbbá a dúsító kultúra is mutatott TCE deklorinációs aktivitást (Cichocka és mtsai 2010). Ennek a génnek a látszólagos hiánya arra enged következtetni, hogy a TCE dehalogenáció, ami az 1241, 3062 és 3051-2 mintában volt megfigyelhető más, eltérő TCE RDázzal rendelkező mikroorganizmusok (úgy, mint *Desulfuromonas*, *Desulfitobacterium* és *Dehalobacter*) által történt, amelyeket már korábban detektáltak a vizsgált területen (Nijenhuis és mtsai 2007, Imfeld és mtsai 2008 és 2011). Ezen mikroorganizmusok részben vagy teljesen részt vehetnek a TCE c-DCE-ig történő dehalogenációjában a korábban említett talajvíz és mikrokozmosz mintákban. Egy további magyarázat az lehet, hogy egy másik *tceA* gén variáns expresszáldhatott, amit az általunk használt primerekkel nem sikerült amplifikálnunk. Több korábbi tanulmány számol be arról, hogy az általunk is alkalmazott primereket használva

nem sikerült sem TCE szennyezett mintákból, sem TCE-bontó kevert kultúrákból *tceA* gént kimutatni (Waller és mtsai 2005, Morris és mtsai 2007). Egy további tanulmány hangsúlyozza, hogy a *tceA* genetikai diverzitását csak részben lehet ezekkel a primerekkel kimutatni (Krajmalnik-Brown és mtsai 2007). Egy friss tanulmányban TCE RDáz és VC RDáz kimutatása bizonyult sikertelennek Bitterfeldből származó dúsító kultúrában RDáz gének diverzitás-vizsgálata során, ahol többszörösen degenerált primereket használtak. Deklorinációs aktivitást detektáltak a mintában (Kaufhold és mtsai 2013), ennek ellenére negatív eredményt kaptak a vizsgálatok során. Holott, a *Dehalococcoides mccartyi* BTF08 törzs teljes genom szekvenciájában (CP004080) megtalálható a *tceA* gén és a primerek cél szekvenciája teljesen illeszkedő (Pöritz és mtsai 2013). Ez azt sugallja, hogy a mi mintáink *Dehalococcoides* populációja is tartalmazta a cél gént, de a PCR detektálás sikertelennek bizonyulhatott. A primerek részleges szekvenciájával hasonlósági kereséseket végeztünk, így kiderült, hogy a 2490R primer utolsó 14 nukleotidja (3' vég) tökéletes egyezést ad egy olyan helyen is a szekvenciában, ami a cél szekvencián kívülre esik, és hogy ugyanennek a primernek az utolsó 11 nukleotidja egy további egyezést mutat a másik DNS szállal. Ráadásul, a 797F primer utolsó 9 bázisa (3' vég) egyezést mutat további 9 hellyel a genomban. Ezért a primerek részleges annealációja a cél szekvencián kívüli gén szakaszokkal primer meghosszabbodást kezdeményezhet, és ezáltal csökkentheti a hatékonyságot, és közreműködhet a cél gén PCR detektálásának sikertelenségében. Ezért **a PCR-rel megállapított *tceA* gén hiányt, a gén jelenlétét, illetve aktivitását óvatosan kell kezelünk, hiszen a PCR amplifikáció hamis negatív vagy pozitív eredményt mutathat. Megoldást ilyen esetben a PCR termék bázissorrend elemzése jelenthet, legalább a hamis pozitívak kiválasztására.**

7.2.3.2. A *vcrA* és *bvcA* gének

Három talajvíz mintában (1241, 3051 és ML-d7) mutattuk ki a *vcrA* gént, a mesterséges lúp mintákban, valamint az összes mikrokozmosz mintában (588/589-1, 588/589-2, 5261, 3051-1) és a 3051-2 dúsító kultúrában. Ezekben a mintákban eténig

történő reduktív deklorináció történt (43,3-526 µg/l), ahogyan azt korábban már leírtuk (Nijenhuis és mtsai 2007, Imfeld és mtsai 2008 és 2010) (Melléklet 2. táblázat).

A PCR termékek direkt bázissorrend meghatározása és a későbbi hasonlósági vizsgálatok egyértelmű (egységes, SNP-t nem mutató) szekvenciát eredményeztek, ami a *Dehalococcoides mccartyi* GT törzs *vcrA* génjével mutatott azonosságot (100%) (6. táblázat). Ez a törzs TCE-t, c-DCE-t és VC-t használ elektron akceptorként növekedéséhez (Sung és mtsai 2006). Ez összhangban van az általunk detektált eredményekkel, hiszen a vizsgált rendszerekben ott tudtunk *vcrA* gént kimutatni, ahol az elektron akceptor TCE, c-DCE vagy VC volt.

A *bvcA* gént azokban a mintákban tudtuk kimutatni, ahol etén termelést detektáltunk, a mesterséges lúp mintában (BMH-WL), amit c- (1069 ± 269 µg/l) és t-DCE-vel ($258 \pm 98,6$ µg/l) kezelték, illetve az 588/589-1 és 3051-1 mikrokozmoszokban, amelyekhez VC-t adagoltak. Minden *bvcA* gén a *Dehalococcoides* BAV1 törzsszel mutatott hasonlóságot (BMH-WL 100% hasonlóság, 588/589-1 98% hasonlóság, 3051-1 97% hasonlóság) (6. táblázat). Mintáinkban a *bvcA* gén jelenléte összefüggésben van az eténig történő reduktív deklorinációs aktivitással. Azonban, a *bvcA* gént nem tudtuk kimutatni a párhuzamos 588/589-2 mikrokozmosz mintában, ahol t-DCE volt a fő elektron akceptor (6. táblázat). Ez arra mutat rá, hogy egy másik gén lehet felelős a t-DCE-ből származó VC dehalogenációjáért. Azonkívül, eredményeink azt is mutatják, hogy mind a *bvcA*, mind pedig a *vcrA* gén egyidejűleg jelen lehet. Dugat-Bony és munkatársai (2012) hasonló megállapítást tettek terepi biostimulációs vizsgálataik során. Az azonban továbbra is tisztázatlan marad, hogy vajon a két gén jelenléte egyetlen genomban vagy a két gén együttes detektálása jelzi a két külön *Dehalococcoides* populáció jelenlétét.

Jóllehet, sem a *vcrA*, sem a *bvcA* gént nem tudtuk kimutatni a BMH talajvíz mintában, amelyben t-DCE (284 ± 36 µg/l) és c-DCE (1062 ± 64 µg/l) voltak a fő szennyezők, a neki megfelelő mesterséges lúp mintában sikerült e géneket detektálnunk. A mesterséges lúp mintában VC-ot (< 5 és 518 ± 13 µg/l között) és etént (< 5 és 102 ± 5 µg/l között) detektáltunk 430 nappal a talajvíz adagolás után, ami

reduktív deklorináció jelenlétére utal (Imfeld és mtsai 2010). A *vcrA* és a *bvcA* gének együttes jelenléte azt jelenti, hogy mind a két gén részt vett a folyamatban.

Eredményeink azt mutatták, hogy a talajvíz, a mesterséges láp és a mikrokozmosz minták ugyanazt a *Dehalococcoides mccartyi*-rokon baktériumot tartalmazták, viszont különböztek reduktív dehalogenáz génjeikben. Ez azt jelzi, hogy azonos törzsbe tartozó különféle funkcionális alcsoportok lehetnek jelen, hasonlóan Futagami (2011) és Ritalahti (2006) megfigyeléseihez.

Csak a *vcrA* gén volt jelen, amikor TCE vagy DCE voltak a fő szennyezők. Hasonlóan, Morris és munkatársai (2007) azt találták, hogy csak *vcrA* expresszáldott dúsító kultúrájukban és a *bvcA* gént nem tudták amplifikálni az alkalmazott primerekkel, a bázissorrend variabilitása miatt. Ez megegyezik annak a korábbi tanulmánynak az eredményével, amelyben kimutatták, hogy ugyanebben a dúsító kultúrában lévő VC RDáz a szubsztrát használati mintázat függvényében volt jelen (Waller és mtsai 2005).

A *bvcA* gén jelentős variabilitást mutatott a minták között, míg a *vcrA* gén minden mintában megegyezett (6. táblázat). Ez arra utal, hogy további *bvcA* gén szekvencia variánsok léteznek. Ezek a variációk érinthetik akár a primer kötődési helyeket is, és negatív PCR amplifikációt eredményezhetnek (az általunk alkalmazott primerekkel és PCR körülmények között).

Nem tudtunk RDáz géneket kimutatni a 3062, ML-d4 és BMH talajvíz mintákban. Egyik lehetséges magyarázat erre az, hogy a fő szennyező az ML-d4 és BMH mintákban a c- és t-DCE voltak, csekély mennyiségű VC és etén mellett, ami arra utal, hogy a DCE és a VC deklorinációja csak nagyon kis mértékben valósult meg. A *vcrA* és a *bvcA* gének hiányát azokban a mintákban tudtuk detektálni, ahol a kiindulási DNS koncentrációk nagyon kicsik voltak, ami az amplikonok nagyon kis koncentrációját eredményezhette. Egy másik lehetőség, hogy más mikroorganizmusok, amelyek képesek a klórozott szénhidrogéneket tolerálni vagy a dehalogenációjukban részt venni, pl. *Geobacter* vagy *Dehalobacter* (Nijenhuis és mtsai 2007, Imfeld és mtsai 2008 és 2010) lehetnek jelen a vizsgált mintákban és az ő RDáz

gégeiket nem tudtuk amplifikálni az alkalmazott primerekkel, illetve PCR körülmények között.

7.3. A SNUPE módszer fejlesztés eredményei

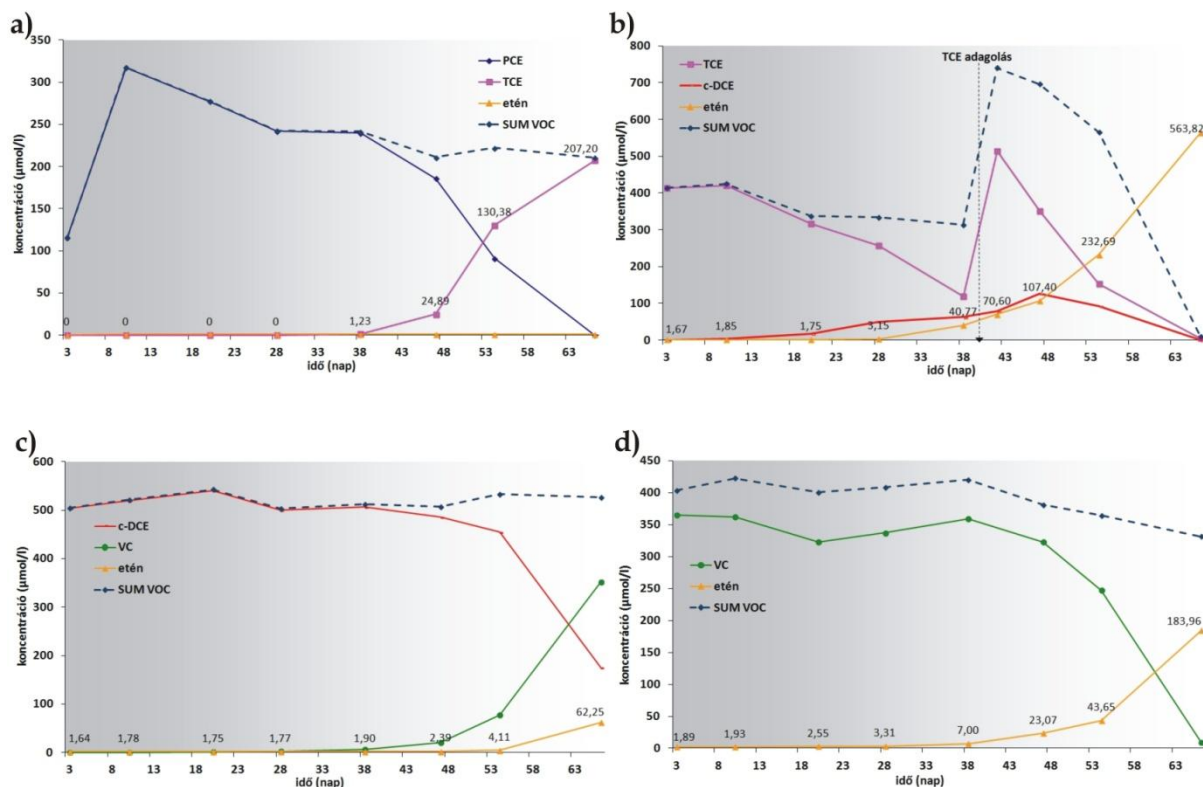
7.3.1. A mikrokozmoszok kémiai eredményei

A különböző típusú mikrokozmoszoknál minden esetben – a negatív, abiotikus kontrollok kivételével – az elektron akzeptorként beadagolt szennyezőanyag biológiai bontását (részletes eredményeket lásd a *Mellékletben* – 3. táblázat) figyeltük meg (22. ábra). A TCE-vel kezelt dúsítóknál olyan hatékony degradációt tapasztaltunk, hogy a 41. napon ismételt szennyezőanyag adagolást (1 µl ≈ 400 µmol/l tiszta oldószer) végeztünk (22. b) ábra). A különböző típusú, RNS izolálásra kiválasztott mikrokozmoszok kémiai adatait a 66. napig, a mintavételig tüntettük fel a 21. ábrán.

A PCE-nel kezelt 2.1. számú mikrokozmoszban (22. a) ábra) az elektron akceptor koncentrációja folyamatosan csökkent és ezzel párhuzamosan a bomlástermékek koncentrációjában folyamatos növekedést tapasztaltunk (leginkább a TCE koncentrációjában, de a c-DCE és a VC koncentrációja is növekedett, kis mértékben – lásd melléklet) a 38. mintavételi naptól. A 66. mintavételi napra a PCE teljes mennyisége lebomlott.

A TCE-nel kezelt 3.2. számú mikrokozmosz (22. b) ábra) esetében nagyon intenzív degradációt tapasztaltunk: a 38. mintavételi napra a beadagolt TCE kb. 72%-a alakult át bomlástermékekké. Az etén – mint ártalmatlan végtermék – koncentrációjában ettől az időponttól a 66. napig jelentős növekedést tapasztaltunk. Erre az időpontra a TCE csaknem teljes mennyisége átalakult bomlástermékekké.

A c-DCE-vel kezelt 4.3. számú mikrokozmoszban (22. c) ábra) a 47. mintavételi naptól detektáltuk a szennyezőanyag csökkenését és ezzel párhuzamosan a bomlástermékek növekedését. Az etén koncentrációjában az 54. naptól ugrásszerű növekedést tapasztaltunk.



22. **ábra.** A mikrokozmoszok kémiai eredményei. a) PCE (2.1.), b) TCE (3.2.), c) c-DCE (4.3.) és d) VC (1.1.) az elektron akceptor, SUM VOC jelöli az összes illékony szerves vegyület koncentrációját.

A c-DCE-vel kezelt 4.3. számú mikrokozmoszban (22. c) *ábra*) a 47. mintavételi naptól detektáltuk a szennyezőanyag csökkenését és ezzel párhuzamosan a bomlástermékek növekedését. Az etén koncentrációjában az 54. naptól ugrásszerű növekedést tapasztaltunk.

A VC-dal kezelt 1.1. számú mikrokozmoszban (22. d) *ábra*) folyamatos csökkenést észleltünk a beadagolt elektron akceptor koncentrációjában és ezzel párhuzamosan növekedést a bomlástermék (etén) koncentrációjában. A 66. napra a beadagolt VC közel teljes mennyisége lebomlott eténné.

Mint ahogyan az a 22. *ábrából* látható, minden kiválasztott mikrokozmosz esetében intenzív biológiai degradációt tapasztaltunk. Az abiotikus kontrollokban nem történt biodegradáció (semmilyen bomlásterméket nem tudtunk kimutatni) a kísérlet időtartama alatt (lásd *Melléklet 3. táblázat*). A beadagolt szennyezők

koncentrációjában bekövetkezett ingadozásokat mérési hiba, illetve az illékony vegyületek fázisegyensúly ingadozása okozhatta.

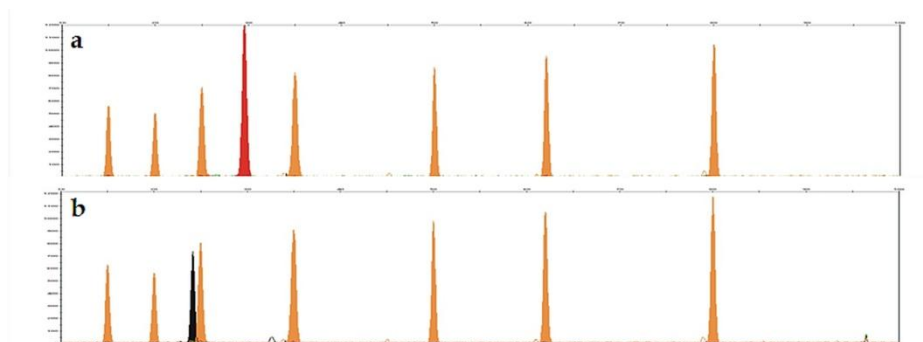
7.3.2. A klónokat elkülönítő SNuPE próbák

Az általunk tervezett csoportspecifikus primereket és a SNuPE próbákat először az RDáz klónokból nyert DNS mintákon teszteltük egyesével. A csoportspecifikus PCR-ek rendre specifikusnak bizonyultak a két főcsoportra.

Ezek után került sor a SNuPE próbák tesztelésére, a csoportspecifikus PCR termékek felhasználásával.

7.3.2.1. Az 1. RDáz csoport eredményei

Ahogy az a bevezetőben illetve a 11. ábrán bemutattuk, az 1. RDáz főcsoportba az „A-I-J-K” és a „H” alcsoportok tartoztak. Ezen csoportok szekvenciáiban megpróbáltunk variábilis régiókat keresni és próbáinkat ezekre a régiókra megtervezni, úgy, hogy az adott csoportra specifikusak legyenek. A SNuPE reakcióban végbemenő primer hosszabbodás során, a vártak megfelelően, az „A-I-J-K” csoport esetében egy timin (piros jelet ad), a „H” alcsoport esetében pedig egy citozin (fekete jelet ad) épült be (23. ábra).



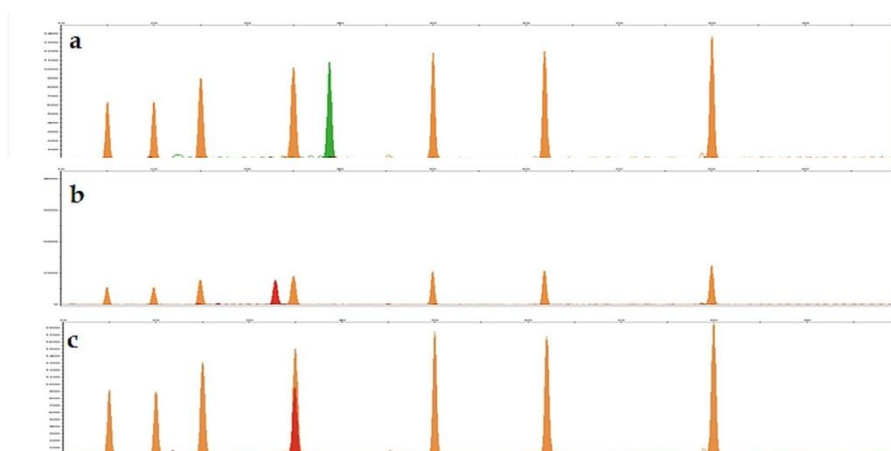
23. ábra. Az 1. csoportba tartozó klónok detektálása. a) az „A-I-J-K” csoportba tartozó 56. klón, b) a „H” csoportba tartozó 34. klón. Narancssárga csúcsok jelölik a LIZ-120 belső méret standardot.

A könnyebb elkülöníthetőség miatt SNuPE próbáink, a poli-T módosítóknak (timin bázisok) köszönhetően, hosszukban is különböztek (rendre 25 illetve 21 bázis). Azonban mint ahogyan az a 23. ábráról is látható, az „A-I-J-K” csoportba tartozó 56. klón 25 bázis helyett négy bázissal később, 29 bázisnál adott jelet (23. a ábra). Ehhez hasonlóan a „H” csoport esetében 21 bázis helyett 23 bázisnál látható csúcs az kromatogramon (23. b ábra). Ez a csúszás („drift”) abból adódhat, hogy a különböző beépülő nukleotidok illetve a különböző fluorofórok hatással vannak a termékek migrációjára (Li és mtsai 2002). A csúszáshoz még az is hozzájárulhat, hogy a termékek és a belső méret standard különböző fluorofórral jelöltek, ezért különbözőképpen „vándorolnak” a polimerben. Vallone és munkatársai (2004) is megfigyeltek hasonló jelenséget kapilláris elektroforézis során, ők megállapították, hogy a méretbeli ingadozások függnék a szekvencia hosszától, a szekvencia összetételétől, a fluorofórtól illetve az elválasztás körülményeitől (pl. különböző polimerek). Nikolausz és munkatársai (2008) a *Dehalococcoides* alcsoportok tipizálásánál tapasztaltak 2-3 bázisnyi csúszásokat a kiértékelt kromatogramok és a megbecsült primer hosszabbodások között.

7.3.2.2. A 2. RDáz csoport eredményei

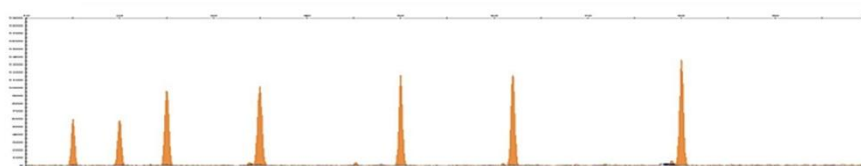
A 2. főcsoportba a „D”, az „E-G” és az „F” alcsoportok tartoztak (11. ábra). Ebben az esetben is különböző hosszúságú SNuPE próbákat alkalmaztunk, poli-T módosítókkal kiegészítve a primereket (rendre 29, 35 és 37 bázis hosszúságú). A SNuPE reakcióban végbemenő primer hosszabbodás során, a vártak megfelelően, a „D” csoport esetében egy timin (piros jelet ad), az „E-G” alcsoport esetében szintén egy timin (piros jelet ad), míg az „F” csoport esetében egy adenin (zöld jelet ad) épült be (24. ábra). Mint, ahogy az 1. főcsoportnál, úgy a 2. főcsoport esetében is tapasztaltuk a csúcsok elcsúszását. Az „F” csoportba tartozó 17. klón 37 bázis helyett 39 bázisnál (24. a ábra), a „D” csoportba tartozó 7. klón 29 bázis helyett 33 bázisnál (24. b ábra), míg az „E-G” csoportba tartozó 19. klón 33 bázis helyett 35 bázisnál (24. c ábra) ad jelet az kromatogramon. Úgy az 1. főcsoport, mint a 2. főcsoport esetében

sem zavarták a korábban már említett csúszások az egyes alcsoportokra jellemző csúcsok elkülönítését.



24. ábra. A 2. csoportba tartozó klónok detektálása. a) az „F” csoportba tartozó 17. klón, b) a „D” csoportba tartozó 7. klón, c) az „E-G” csoportba tartozó 19. klón. Narancssárga csúcsok jelölik a LIZ-120 belső méret standardot.

Miután minden klón esetében külön-külön specifikus primer hosszabbodást tapasztaltunk, tovább teszteltük SNUPE primereink csoport-specifikusságát primer keverékeket alkalmazva. Ebben az esetben is specifikus primer hosszabbodásokat tudtunk detektálni, ugyanúgy, mint amikor a primereket egyesével, külön-külön reakcióban alkalmaztuk. Elvégeztük a negatív kontroll vizsgálatát is a primer keverékekkel, a DNS templátot kihagyva a reakcióból. Ekkor kizárólag a belső méret standard csúcsait detektáltuk (25. ábra).



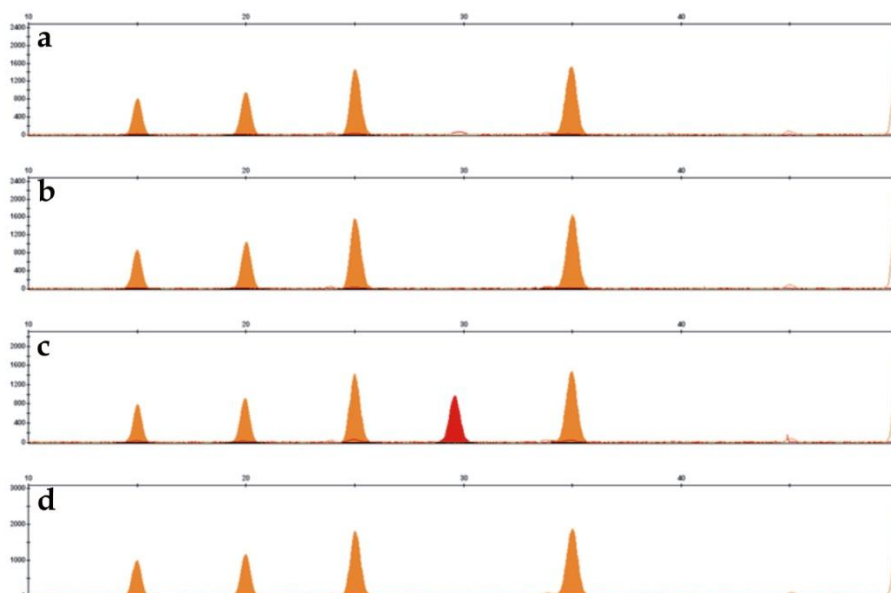
25. ábra. A negatív kontrollban csak a LIZ-120 belső méret sztenderdet jelölő csúcsok láthatóak.

7.3.3. Az RDáz csoportok kimutatása a különböző típusú mikrokozmoszokban

A különböző típusú (különböző elektron akceptort tartalmazó) mikrokozmoszokból a 66. napon, amikor már megfelelő degradációs aktivitást mértünk, teljes RNS kivonást végeztünk. Az RNS-ek felhasználásával elvégeztük a

különböző RDáz csoportok együttes kimutatását. Arra voltunk kíváncsiak, hogy bizonyos elektron akceptor adagolásakor mely reduktív dehalogénáz gén(ek) expresszálódik(nak). A későbbiekben pedig ezen eredmények tükrében szeretnénk volna megbecsülni szennyezett területek reduktív deklorinációs aktivitását illetve a területen található mikrobák lebontási potenciálját.

Először az 1. főcsoportra végeztük el a SNuPE reakciót és egyetlen esetben kaptunk csúcsot, a TCE-nel kezelt 3.2. mikrokozmosz minta esetében egy piros, timinnek megfelelő csúcsot 29 bázisnál (26. ábra). Ez a csúcs (a „drift”-et is figyelembe véve, lásd korábban) az „A-I-J-K” csoportnak felel meg (lásd még 23. ábra). A „H” csoportra jellemző, fekete, citozinnak megfelelő csúcsot egyik mikrokozmosz minta esetében sem detektáltuk.



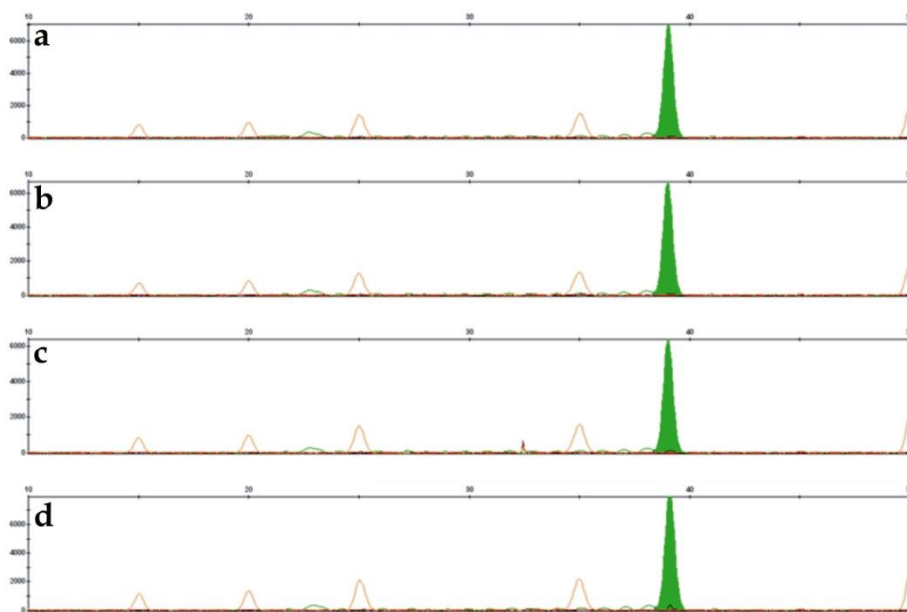
26. ábra. A mikrokozmosz RNS minták 1. csoportra specifikus próbákkal történő kimutatása a) VC, b) PCE, c) TCE, d) c-DCE az elektron akceptor.

Mivel az „A-I-J-K” csoportnak megfelelő csúcsot csak a TCE-nel kezelt mikrokozmosz mintában tudtuk kimutatni, feltételezhetjük, hogy ebben az esetben egy új triklóretén reduktáz gént sikerült azonosítanunk. Ennél a mikrokozmosznál nagyon intenzív TCE degradációt tapasztaltunk, a 38. mintavételi napra a beadagolt szennyezőanyag kb. 72%-a lebomlott, ez is utalhat egy triklóretén reduktáz gén expressziójára. Azért feltételezhetjük, hogy egy új génről lehet szó ez

esetben, mivel az általunk detektált gén bázissorrendje csak nagyon minimális szekvencia hasonlóságot mutat az ez idáig leírt *tceA* génekkel (pl. *Dehalococcoides mccartyi* 195 törzs *tceA* génje, illetve *D. mccartyi* FL2 törzs *tceA* génje, Magnuson és mtsai 2000, He és mtsai 2005).

Ha helyes azon feltételezésünk, hogy az „A-I-J-K” csoport esetében egy új TCE reduktáz gént sikerült kimutatnunk, felmerülhet az a kérdés, hogy miért nem detektáltunk ennek az RDáz génnek megfelelő csúcsot a 2.1. számú, PCE-nel kezelt mikrokozmosz esetében is. Feltételezhetően azért, mert a 2.1. számú mikrokozmosznál a mintavétel idején még nem indult meg a PCE bontásából származó TCE bontása (lásd a részletes kémiai adatokat a mellékletben).

A 2. főcsoportra elvégzett SNUPE reakció során minden mikrokozmosz RNS minta esetében egy zöld, adeninnek megfelelő csúcsot detektáltunk, 39 bázisnál (27. ábra). Ez a csúcs (a szokásos csúszást is figyelembe véve) az „F” csoportnak felel meg (lásd még 24. ábra).



27. ábra. A mikrokozmosz RNS minták 2. csoportra specifikus próbákkal való kimutatása a) VC, b) PCE, c) TCE, d) c-DCE az elektron akceptor. Narancssárga vonalak jelölik a LIZ-120 belső méret standardot.

A második főcsoport vizsgálatakor detektált redukzív dehalogenáz génről („F” alcsoport) sajnos nem tudjuk pontosan megállapítani, hogy melyik RDáz gén

lehet. Az egyik lehetőség az, hogy egy olyan vinil-klorid reduktáz gént sikerült detektálnunk, amelynek bázissorrendje különbözik az eddig leírt vinil-klorid reduktázoktól (*vcrA*, illetve *bvcA* gének). Ezt a feltételezésünket azonban még további kísérletekkel is alá kellene támasztanunk. Olyan mikrokozmosz kísérletek deríthetnének fényt erre a kérdésre, ahol a beadagolt szubsztrát nem klórozott etén, hanem például klórozott etán. Más kutatócsoportok korábban kimutatták, hogy néhány RDáz konstitutívan expresszálódik (Wagner és mtsai 2009), ezért nem tudunk messzemenő következtetéseket levonni abból, hogy ez az RDáz gén minden szennyezőanyag adagolás esetében expresszálódik.

A többi RDáz csoport („H”, „D” illetve „E-G”) esetében több különböző magyarázat is lehetséges arra vonatkozóan, hogy miért nem tudtuk detektálni őket az RNS mintákból:

- i) Egyrészt a SNuPE módszernél is, mint minden PCR-alapú módszer esetében számolnunk kell a *preferenciális amplifikáció* lehetőségével. Tehát lehetséges az, hogy például kisebb abundanciájú szekvenciavariánsok aránya az amplifikáció során lecsökken, esetleg amplifikációjuk meg sem történik (Sipos és mtsai 2007). Továbbá a preferenciális ligálás (Palatinszky és mtsai 2011) torzító hatásával is számolnunk kell az RDáz gének klónozása során. A multitemplát PCR termékek TA-klónozása során a különböző szekvencia variánsok aránya a ligálás szelektivitása miatt ugyanis megváltozhat. Ezért lehetséges például az, hogy egy eredetileg nagyobb abundanciájú szekvenciavariáns kisebb frekvenciával jelenik meg a klónkönyvtárban és fordítva. Ez magyarázatul szolgálhat arra, hogy a „H” alcsoportot egyáltalán nem tudtuk detektálni az „A-I-J-K” alcsoport mellett az 1. főcsoport vizsgálatakor, ha megnézzük az alcsoportok klónozáskor kapott arányát (*klónfrekvenciák*):

$$61,1\% („A-I-J-K”) : 1,1\% („H”).$$

- ii) Egy másik elképzelhető magyarázat a hiányzó alcsoportokra az lehet, hogy a BTF08 dúsító kultúra RDáz gén diverzitásának vizsgálata (klónozás, bázissorrend elemzés) DNS alapon, míg a SNuPE vizsgálatok RNS-alapon történtek. Előfordulhat tehát az is, hogy bizonyos DNS alapon meglévő RDáz

gének a szubsztrát adagolások során nem expresszázódtak, ezért nem tudtuk a SNUPE során kimutatni őket, illetve az RNS sérülékenysége és kis stabilitása is okozhat torzulást az eredményekben.

- iii) Az RDáz gének hiánya magyarázható az mRNS-ek kis koncentrációjával is a releváns mintákban. *Lee és munkatársai (2006)* közölték, hogy a reduktív dehalogenáz gén transzkriptumok féléletideje a klórozott etének nélkül csak néhány óra.
- iv) A reduktív dehalogenázok diverzitásának vizsgálata során a klónozáshoz használt primerek (RRF2 és B1R) többszörösen degeneráltak, hiszen tervezésük alapjául konzervatív aminosav szekvenciák szolgáltak (*Krajmalnik-Brown és mtsai 2004*). A DNS szekvenciák ebben a régióban nem feltétlenül konzervatívak, különböző primer kötődési energiákhoz vezetve ezzel és ezáltal preferenciális amplifikációhoz.

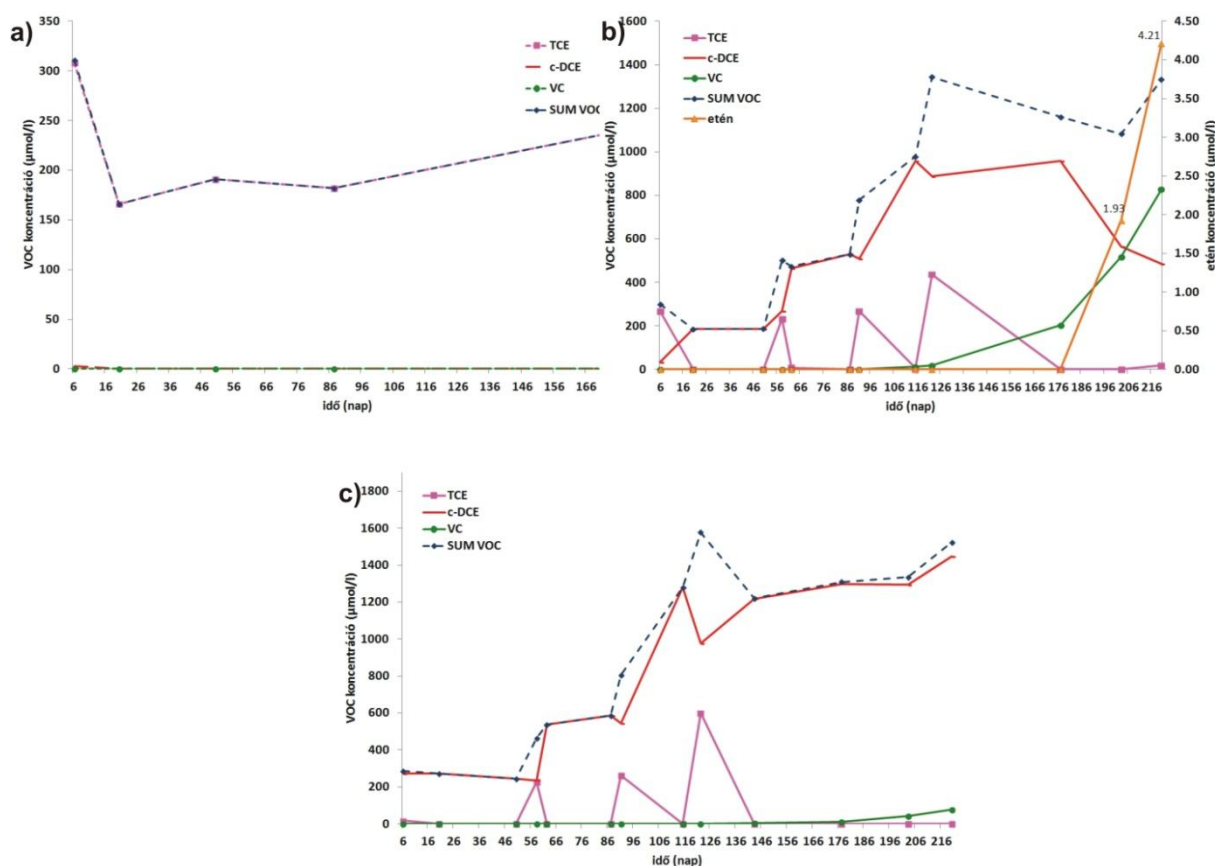
Végül, a BTF08 kultúra vizsgálataiból (*Kaufhold és mtsai 2013, Cichocka és mtsai 2010*) az derül ki, hogy annak ellenére, hogy valószínűleg egy fajta *Dehalococcoides* törzs (16S rDNS szekvencia alapján) van jelen a dúsító kultúrában, e mögött az egy törzs mögött számos különböző RDáz készlet található.

7.4. A háromfázisú mikrokozmoszok eredményei

7.4.1. TCE és bomlástermékeinek vizsgálata

Minden egyes mikrokozmoszban – az abiotikus kontroll kivételével – megfigyeltük a TCE biodegradációját c-DCE bomlástermék jelenlétében már az első mintavétel során (6. nap). A leghatékonyabb deklorinációt az acetát kezelésű mikrokozmoszokban mutattuk ki, ahol a TCE kb. 95%-a átalakult c-DCE-vé. Az 50. napra közel a teljes TCE mennyiség átalakult c-DCE-vé minden mikrokozmoszban, ezért újraadagoltuk a TCE-t (300 µmol/l). A következő 30 nap során az összes TCE eltűnt a mikrokozmoszokból és ez összhangban volt a c-DCE növekedésével (28. ábra). A 121. napon a biotikus és az acetát kezelt mikrokozmoszokhoz újra TCE-t adagoltunk (300 µmol/l). Az abiotikus kontrollhoz azért nem adagoltunk ismét TCE-t, mert itt egyáltalán nem történt TCE degradáció.

A biotikus mikrokozmoszokban VC jelent meg a 115. napon és idővel felhalmozódott. Etént – mint ártalmatlan végterméket – a 203. naptól detektáltunk, és koncentrációjában a 220. napig növekedést tapasztaltunk (28. b) *ábra* és *Melléklet 7. táblázat*).



28. ábra. A TCE és bomlástermékeinek koncentráció változása időben az (a) abiotikus kontrollban, (b) a biotikus kontrollban, (c) az acetáttal kezelt mikrokozmoszokban.

Az acetát kezelt mikrokozmoszban a TCE biodegradációjával párhuzamosan a c-DCE koncentráció növekedését tapasztaltuk. VC-t a 115. naptól tudtunk kimutatni, bár kiindulásként igen kis koncentrációban ($0,72 \mu\text{mol/l}$) jelen volt. Annak ellenére, hogy a VC koncentrációja időben növekedett, a 220. napig nem tudtunk etént kimutatni (28. c *ábra*).

Az abiotikus kontrollokban nem történt biodegradáció a kísérlet időtartama alatt. A kezdetben beadagolt TCE koncentrációjában (417 µmol/l) bekövetkezett csökkenés a talajszemcsékhez való kikötődéssel magyarázható (28. a) ábra).

7.4.2. Taxon-specifikus kimutatások

A *Dehalococcoides* sp., a *Desulfotobacterium dehalogenans*, a *Dehalobacter restrictus*, a *Desulfomonile tiedjei* és a *Desulfohalomonas chloroethenica* szervezeteket vizsgáltuk 16S rDNS és rRNS alapon a kiindulási és a 220. napos mikrokozmosz mintákban (7. táblázat). A 220. napon a *Dehalococcoides* sp. minden mintában nagy kópiaszámban volt jelen rRNS alapon. A *D. dehalogenans* és a *D. tiedjei* – ezen szervezetek PCE és TCE lebontást végző baktériumok (DeWeerd és mtsai 1990, Utkin és mtsai 1994) – PCR-alapú kimutatása nem eredményezett detektálható amplikont a vizsgált mintákban. A *D. restrictus* specifikus vizsgálat pozitívnak bizonyult a kiindulási mintában mind rDNS, mind pedig rRNS alapon, mindamellett, a többi mikrokozmosz minta (220. nap) csak DNS alapon adott pozitív eredményt. A *D. chloroethenica* (Krumholz, 1997), olyan szervezet, amely képes a PCE-t és a TCE-t is elektron akzeptorként használni. Minden mintában megfigyelhető volt, kivéve a biotikus mikrokozmosz RNS mintáját.

7. táblázat. A dehalogénező taxonok illetve a dehalogénáz gének specifikus kimutatásainak összefoglalása a háromfázisú mikrokozmoszokban.

Specifikus tesztek	Kiindulási talajvízminta		Biotikus (220. nap) mikrokozmosz		Acetát (220. nap) kezelésű mikrokozmosz	
	DNS	RNS	DNS	RNS	DNS	RNS
DHC-1	+++	-	+++	+	+	-
DHC-2	+	+	+	+	+	+
DD	-	-	-	-	-	-
DR	+++	+++	+	-	+++	-
DT	-	nd.*	-	nd.*	-	nd.*
DC	+++	+++	+++	-	+++	+++
<i>tceA</i>	-	-	+	-	+	-
<i>bvcA</i>	-	-	+++	-	+	-
<i>vcrA</i>	+	+	+	-	+	-

*nd. = nincs adat a kis RNS koncentrációnak köszönhetően

7.4.3. RDáz gének vizsgálata

Egy triklóretén reduktáz (*tceA*) és két putatív vinil-klorid reduktáz gént (*bvcA* és *vcrA*) vizsgáltunk (7. táblázat). A *tceA* amplikonjait nem tudtuk detektálni mRNS szinten és DNS szinten is csak két mintában (biotikus és acetát kezelt mikrokozmoszok). Ennek a génnek a hiányát magyarázhatjuk az mRNS kis koncentrációjával a releváns mintákban, mivel a TCE már c-DCE-vé degradálódott a mintázás idejére (a kiindulási mintákban is – nem közölt adatok).

A *bvcA* amplikont két DNS mintában (biotikus és acetát kezelt mikrokozmosz) tudtunk detektálni, habár a VC degradációja eténig csak a biotikus mikrokozmoszokban történt meg. A teszt pozitív eredménye a *Dehalococcoides mccartyi* BAV1 (*Krajmalnik-Brown és mtsai 2004*) törzs jelenlétére utal a mintákban.

A *vcrA* gént az összes DNS mintában és a kiindulási RNS mintában ki tudtuk mutatni, holott VOC analízissel VC deklorinációt csupán a biotikus mikrokozmosz mintákban detektáltunk. Ennek a transzkriptumnak a hiánya a kis mRNS koncentráció, vagy az amplikon kimutatási határ alatti koncentrációjának következménye.

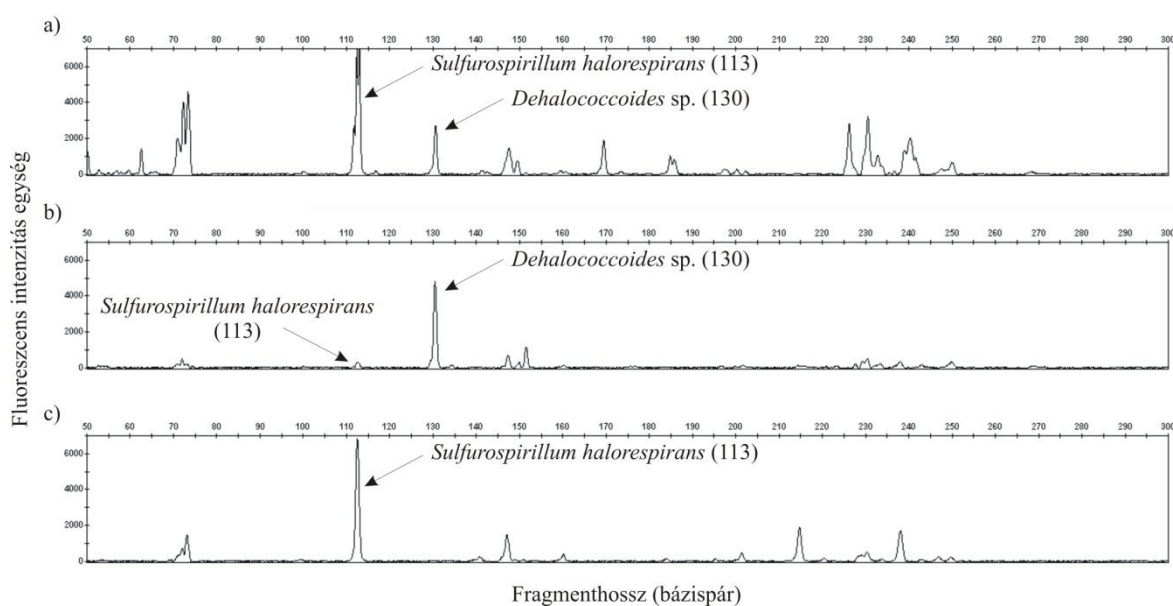
7.4.4. A háromfázisú mikrokozmoszok T-RFLP eredményei

Minden egyes mikrokozmosz Bacteria molekuláris ujjlenyomat profilját létrehoztuk azért, hogy nyomon követhessük a bakteriális közösségben a különböző adagolások hatására bekövetkezett változásokat. Hogy azonosítani tudjuk az egyes TR-eket, a kiindulási rRNS minta 16S rRNS génjét amplifikáltuk, klónoztuk és bázissorrend elemzésnek vetettük alá. A reprezentánsok bázissorrend elemzése azt mutatta, hogy a klónok öt különböző filogenetikai csoportba tartoztak: β -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria*, δ -*Proteobacteria*, ε -*Proteobacteria* és *Chloroflexi*. Ezen kívül még számos anaerob deklorináló baktériumot (úgy, mint *Sulfurospirillum halorespirans*, *Geobacter psychrophilus*, *Geobacter lovleyi*, *D. chloroethenica*, *Dehalogenimonas lykanthroporepellens* és *D. ethenogenes*) és egy szulfátredukáló szervezetet (*Desulfopila aestuarii*) is ki tudtunk mutatni (8. táblázat).

8. táblázat. A kiindulási rRNS mintából kinyert klónok beazonosítása.

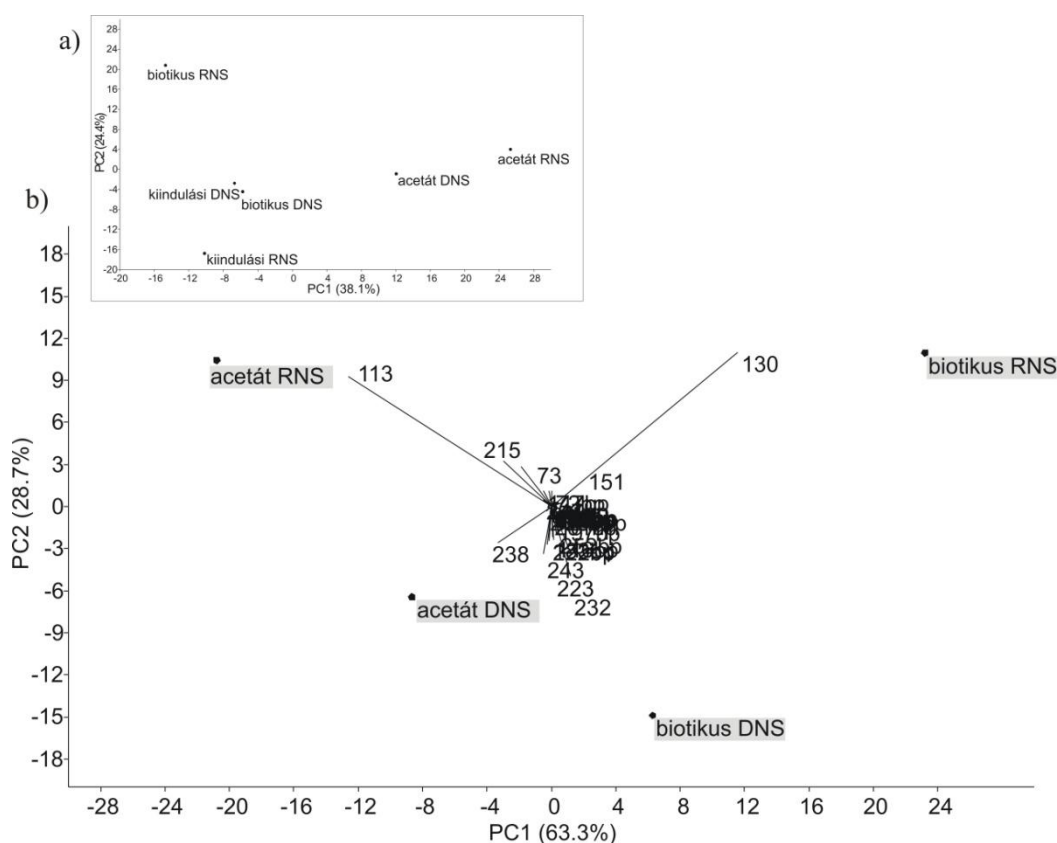
Filogenetikai csoport	Klón jelölése	A legközelebbi filogenetikai rokon	Hasonlóság (%)	Azonosító szám	T-RF méret (bp)	
					<i>AluI</i>	<i>Bsh1236I</i>
β -Proteobacteria	R1_A9	<i>Simplicispira limi</i>	100,0	DQ372987	147	201
	R1_C4	<i>Aquabacterium citratiphilum</i>	97,4	AF035050	228	200
γ -Proteobacteria	R1_B9	<i>Pseudomonas agarici</i>	98,7	Z76652	231	384
ϵ -Proteobacteria	R1_A10	<i>Sulfurospirillum halorespirans</i>	96,0	AF218076	113	388
δ -Proteobacteria	R1_A2	<i>Desulfopila aestuarii</i>	91,8	AB110542	152	58
	R1_D9	<i>Geobacter psychrophilus</i>	96,1	AY653549	249	106
	R1_E11	<i>Geobacter lovleyi</i>	95,0	CP001089	72	388
	R1_E12	<i>Desulfuromonas chloroethenica</i>	99,4	U49748	184	237
<i>Chloroflexi</i>	R1_A6	<i>Dehalogenimonas lykanthroporepellens</i>	94,5	CP002084	226	32
	R1_A7	Tenyésztésbe nem vont klón AN059 16S riboszómális RNs gén	99,0	GQ859935	239	112
	R1_F8	Tenyésztésbe nem vont <i>Anaerolinea</i> sp. klón ZZ-S11G2 16S riboszómális RNS gén	99,0	EF613472	62	110
	R1_F10	<i>Dehalococcoides ethenogenes</i>	97,0	CP000027	130	99
	R1_G4	<i>Levilinea saccharolytica</i>	90,2	AB109439	103	233

A T-RFLP kromatogramok (kizárólag az *AluI* emésztett minták szerepelnek a 29. ábrán, a *Bsh1236I* emésztett minták a Melléklet 4. ábráján láthatóak) a kezelt mikrokozmosz minták esetén mikrobiális diverzitás csökkenést mutattak rRNS szinten, ami a megfelelő szén- és energiaforrás illetve elektron donor szerinti mikroorganizmusok szelekciójára utal. A biotikus mikrokozmoszokban a fő T-RF csúcs a 130 bp-os (29. b) ábra), míg az acetát kezelt mikrokozmosz mintákban a fő rRNS T-RF csúcs a 113 bp-os volt (29. c) ábra).



29. ábra. A közösségi T-RFLP analízis eredménye a háromfázisú mikrokozmoszokban. Az rRNS minták közösségi kromatogramjai *AluI* endonukleázzal való emésztés után (a) a kiindulási mintában, (b) a biotikus mintában a 220. napon, (c) acetáttal kezelt mikrokozmoszban a 220. napon.

A T-RFLP adatok statisztikai vizsgálata azt mutatta (30. ábra), hogy a kiindulási RNS minta teljesen elkülönül a többi mintától sugallva ezzel egy eltérő szerkezetű bakteriális közösséget, ahogyan ez az kromatogramokból is látszott. Ezt és a kiindulási DNS mintát különálló mintaként („outlier”) kezeltük és kihagytuk a további statisztikai elemzésből a jobb áttekinthetőség miatt (29. a) ábra). Az *AluI* emésztett minták főkomponens elemzése azt mutatta, hogy a DNS és rRNS alapú mintázatok elválása a második komponens szerint történt. A 220. napi biotikus mikrokozmosz minták a 130 bp-os T-RF csúcs alapján váltak el a többi mintától, ami a *Dehalococcoides* sp.-nek feleltethető meg. Hasonlóképpen az acetát kezelt mikrokozmoszok rRNS alapú mintázata a 113 bp-os T-RF alapján vált el a többitől, míg a DNS minták elválását a 223, a 232, a 238 és a 243 bp-os T-RF-ek határozták meg (ezeket a csúcsokat eddig nem azonosítottuk).



30. ábra. T-RFLP mintázaton (*AluI* endonukleázzal való emésztés után) alapuló két-dimenziós főkomponens elemzés DNS (■) és rRNS (●) szinten. a) A kiindulási mintákkal együtt ábrázolva. b) A két elkülönülő kiindulási minta kizárásával ábrázolva.

VIII.Összefoglaló értékelés

Az első kísérletek során egy *in situ* kármentesítési (biostimulációs) terület Archaea közösségek diverzitását vizsgáltuk ujjlenyomat módszerekkel. Mintáink eltérő kémiai és geológiai paraméterű helyszínekről származtak. Kidolgoztunk egy gyors, monitorozási eljárást, amivel képesek voltunk a diverzitás-különbségeket detektálni összefüggésben a kémiai paraméterekkel. Ennek során a T-RFLP ujjlenyomat eredményeket és a kémiai eredményeket többváltozós statisztikai vizsgálatnak vetettük alá.

A kémiai eredmények értékelése során megállapítottuk, hogy a **hatékony dehalogenációs folyamatokat leginkább a szulfát és a TOC koncentrációja, a beadagolt szubsztrát tulajdonságai és a terület geológiai paraméterei** (pl. a talajvíz áramlási iránya) **befolyásolják**.

A többváltozós statisztikai vizsgálatokból meghatároztuk, hogy mely kémiai paraméterek gyakorolnak együttes hatást a minták elválására, tehát közvetve az Archaea közösség diverzitására. Megfigyeltük, hogy bizonyos T-RF-ek (illetve a nekik megfeleltethető taxonómiai egységek) minden mintában abundánsak voltak, míg mások területspecifikusnak bizonyultak.

A második vizsgálat során, a *Dehalococcoides* sp. jelenlétét és diverzitását vizsgáltuk és a három RDáz génjét különböző rendszerekben, amelyek olyan talajvízzel voltak táplálva, amelyek ugyanabból a Bitterfeld/Wolfen forrásból származtak.

Eredményeink azt mutatják, hogy a bitterfeldi területről származó, dúsított *Dehalococcoides* sp. (Cichocka és mtsai 2010, Kaufhold és mtsai 2013) jellemző a vizsgált területre és minden rendszerben jelen van. Továbbá, mindkét vinil-klorid redukív dehalogenáz kulcs enzimét, a *vcrA*-t és a *bvcA*-t, párhuzamosan ki tudtuk mutatni, ami arra utal, hogy mindkét gén fontos a klórozott etének eténig történő dehalogenációjában. Azonfelül, a *Dehalococcoides* 16S rRNS gén diverzitását nem befolyásolták a különböző környezeti vagy dúsítási körülmények. Ezzel szemben, az

RDáz gén diverzitását befolyásolták, igazolva ezzel, hogy monitorozási célból, a kulcs lebontó gének detektálása nagyobb fontossággal bír, összehasonlítva a kizárólagos riboszómális gének kimutatásán alapuló vizsgálattal. A *tceA* gén esetében, a pozitív PCR amplifikáció hiánya nem feltétlenül helytálló, mivel ugyanazok vagy sok más szervezet, hasonló génekkel, átveheti a TCE dehalogenációt. Mindamellet, *tceA*-t nem tudtunk kimutatni az általunk vizsgált rendszerekben. Azonban, ezt nem jelenti azt, hogy a TCE nem bomlott le, mivel ezt a folyamatot sikerült kimutatnunk a mikrokozmoszokban, így ez is alátámasztja, hogy **azonos 16S szekvenciával rendelkező *Dehalococcoides* törzsek különböző funkcionalitással rendelkeznek, vagyis nagyon különböző enzimmészleteket tartalmazhatnak.**

Vizsgálataink azt mutatják, hogy **egy faj, sőt egy törzs lehet jelen, de e mögött az egy törzs mögött számos genetikailag különböző készlet** (katabolikus gének különböző készlete) **található és a környezeti tényezőktől** (különösen a halogénezett szénhidrogének, mint elektron akceptorok) **függően az egyik illetve a másik populáció válik dominánssá.**

Gyakorlatban, amikor a klórozott etének eténig történő dehalogenációs potenciálját próbáljuk felbecsülni, a specifikus dehalogenáz gének jelenlétét és diverzitását is meg kell vizsgálnunk. Mindazonáltal, vizsgálataink eredménye csupán egy pillanatfelvétele ezen rendszerek taxonómiai és funkcionális diverzitásának és nem tükrözi a vizsgált rendszerek teljes fejlődését a deklorinációs aktivitást illetően. Ezért, **a geokémiai paraméterek állandó monitorozása mellett szükség lehet a taxon-specifikus és a deklorinációban részt vevő katabolikus gének jelenlét/hiány-alapú vizsgálatára, ahhoz, hogy jobban megismerhessük a klórozott eténekekkel szennyezett területeken zajló mikrobiális folyamatokat.**

A halogénezett szénhidrogén szennyezések esetében fontos tisztában lennünk a szennyezett területen jelenlévő mikrobiális és a lebontás szempontjából fontos funkciógén diverzitással, hiszen nagyon lényeges, hogy lehetőség legyen a teljes, eténig történő dehalogenáció serkentésére és egy esetleges *in situ* beavatkozás során ne a közti termékek (pl. a bizonyítottan rákkeltő vinil-klorid) halmozódjanak fel a

szennyezett területen, sokkal komolyabb problémát okozva ezzel, mint a kiindulási volt.

A dehalorespirációs folyamat során a klórozott szénhidrogének lebontásában résztvevő kulcsenzimek a redukzív dehalogenázok. Az RDáz gének determinálják a deklorináló szervezet szubsztrát tartományát. Ezért az RDáz gének tanulmányozása során betekintést nyerhetünk molekuláris és biokémiai szinten is a deklorináció folyamatába. Általánosabban, az RDáz gének jobb funkció markerek, mint a 16S rRNS, mivel a 16S rRNS szekvenciák nem mindig vannak összhangban a szubsztrát használatával. Ezért, **az RDáz gének meghatározása segíthet fényt deríteni a deklorinációs aktivitás diverzitására.**

Az eddig kimutatott redukzív dehalogenáz gének közül csak némelyiknek ismert a pontos funkciója és úgy tűnik, hogy számos egyéb enzim vár felfedezésre. Nagyon keveset tudunk azoknak a szervezeteknek az ökológiájáról, amelyek ezeket a géneket hordozzák. Ezért fejlesztettünk **egy új molekuláris módszert, ami lehetőséget adott a dehalogenáz gének kimutatására és vizsgálatára szennyezett területeken.** Továbbá **meghatároztuk a lehetséges redukzív dehalogenázok szubsztrát tartományát, illetve vizsgáltuk expressziójukat különböző körülmények között.** Így a klórozott szénhidrogének eltávolításának potenciálját becsültük meg egy adott területen.

Megállapítottuk, hogy korlátai/hibái mellett, illetve ezek ismeretében **a SNuPE módszer alkalmas lehet katabolikus gének, jelen esetben a dehalogenációs folyamatokban alapvető fontosságú RDáz gének expressziójának vizsgálatára.** Két csoportot sikerült detektálnunk mRNS alapú vizsgálatok során, melyek közül az egyik **feltételezhetően egy új triklóretén redukáz gén.**

A jövőben ez a technika megfelelő lehet gén expressziók kimutatására más, a klórozott alifás szénhidrogénektől eltérő szubsztrátok/elektron akceptorok jelenlétében is, mint pl. diklórecetsav, halogénezett aromás vegyületek.

Napjainkban a *Dehalococcoides* sp. kimutatás a molekuláris biológia egyik gyakran alkalmazott módszere a szennyezett területek TCE biodegradációs

potenciáljának megbecslésére (Hendrickson és mtsai 2002, Lendvay és mtsai 2003). Mindazonáltal ennek a taxonnak a jelenléte még nem jelenti aktivitását is (Lendvay és mtsai 2003). Ezzel szemben, **az RNS alapú vizsgálatok sokkal megfelelőbb becslést adhatnak a mikrobiális aktivitásról és így a biodegradációs képességről.** Továbbá, a funkcionálisan fontos gének kimutatása (a redukív dehalogenáció esetében ezek a *tceA*, a *bvcA* illetve a *vcrA*) információt nyújthat a jelenlévő dehalogénező baktériumok specifikus anyagcsere képességéről (Lee és mtsai 2008). Ezért, mikrokozmosz kísérleteink során mind DNS, mind RNS-alapú molekuláris biológiai módszereket alkalmaztunk és a taxon-specifikus kimutatásokat katabolikus gén vizsgálatokkal kombináltuk.

A háromfázisú mikrokozmosz kísérletekben TCE bontásra képes mikrokozmoszokat állítottunk össze egy szennyezett területről származó koncentrált talajvizet alkalmazva. Ezen a területen korábban *in situ* beavatkozás történt (tejipari savanyú savó adagolás). Érdekes módon **a leghatékonyabb TCE deklorináció a bennszülött mikrobák által valósult meg elektron donor adagolás nélkül** (kezeletlen, biotikus kontroll mikrokozmosz), ahol a VC nagyobb koncentrációban képződött, mint bármelyik más mikrokozmoszban. A TCE bontás egy lépéssel tovább is ment és **etén megjelenését** tudtuk detektálni a biotikus mikrokozmoszokban (28. b ábra és Melléklet 7. táblázat).

A TCE-t kétszer adagoltuk újra a kísérletsorozat folyamán és bomlástermékekké való teljes átalakulását tapasztaltuk a biotikus mikrokozmoszokban. Ezzel szemben **az elektron donor és a hidrogén adagolás** (az acetát kezelt mikrokozmoszokban – lásd 28. c ábra) **gyors, de nem teljes TCE degradációt eredményezett.** Ezek a megfigyelések **ellent mondanak a korábbi kísérleti eredményeknek,** ahol molekuláris hidrogén és acetát, mint elektron donor illetve szénforrás adagolással teljes TCE degradációt értek el (Maymo-Gatell és mtsai 1995, 1997, Lee és mtsai 1998, Aulenta és mtsai 2002). Az acetát kezelt mikrokozmoszokban a TCE VC-ig bomlott. Nem történt etén felszabadulás a kezelt mikrokozmoszokban és nem történt deklorináció az abiotikus kontrollokban a 220. napig.

A biotikus kontroll esetében feltételeztük, hogy a korábbi, a **mintavételi területen történt, savanyú savó adagolás következtében az inokulánsként alkalmazott őshonos mikroba közösség pusztán tápanyag adagolással is képes volt a dehalogenációra**. A deklorináló baktériumokat, amelyek már a kiindulási mintában jelen voltak, a bennszülött mikroorganizmusok koncentrálásával és tápanyag illetve B₁₂ vitamin (Zinder 1998, Nijenhuis és mtsai 2007) adagolással dúsítottuk. A tápanyag- és vitaminhiány természetes környezetben gyakran lehet limitálója a mikrobiális aktivitásnak. Néhány anaerob kultúra kiegészítő vitamin és nyomelem adagolást igényel növekedéséhez, illetve ahhoz, hogy hatékonyan tudja bontani a klórozott szénhidrogéneket (Lee és mtsai 1998). Például a *D. ethenogenes* dúsítása B₁₂ vitamint igényel a PCE deklorinációjához (Maymo-Gatell és mtsai 1997), és hasonlóan a *Dehalospirillum multivorans* tiszta tenyészet is B₁₂ vitamint igényel a biológiai redukzív deklorinációhoz (Neumann és mtsai 1994). Továbbá Aulenta és munkatársai (2005) is azt találták, hogy növekedési faktorok (úgy mint élesztő kivonat és B₁₂ vitamin) adagolása kedvező hatással volt a deklorinációra. Az is elképzelhető ugyanakkor, hogy a talaj nagy szerves anyag tartalma (lásd a kémiai adatokat a *Melléklet 4. táblázatában*), mint szénforrás befolyásolhatta pozitívan a deklorináló baktériumok aktivitását.

Az acetát adagolás esetében, az acetát, mint szén- és energiaforrás kompetíciót idézett elő a dehalogenálók és a fermentáló baktériumok között, további versengést okozva a keletkező hidrogénért (He és mtsai 2002). Az is elképzelhető, hogy a NaHCO₃ adagolással acetogén baktériumok még több acetátot és később hidrogént tudtak termelni. Ezért érdemes az acetát koncentrációját végig ellenőrizni egy hasonlóan összeállított kísérletben, ugyanis lehetséges, hogy a nagy acetát koncentráció befolyásolja a bakteriális közösség változását.

Dehalococcoides sp., *D. restrictus*, *D. chloroethenica* és a *vrcA* gén voltak kimutathatóak a kiindulási mintában mind DNS, mind pedig RNS alapon, bizonyítva az inokulumban meg lévő redukzív deklorinációs potenciált.

A taxon specifikus kimutatások összhangban voltak a kémiai eredményekkel, ugyanis a TCE csak részleges degradációjára képes baktériumokat (pl. *D.*

chloroethenica) tudtunk kimutatni az összes kezelt mikrokozmoszban rRNS szinten. A 220. naptól a *D. restrictus* nem volt többé kimutatható rRNS szinten. Ez a nemzetség aktivitásának elvesztését sugallja, melynek tagjai alakítják át a PCE-t és a TCE-t c-DCE-vé (Holliger és mtsai 1998). Ugyanakkor, a DHC-1 teszt (utalva a *Dehalococcoides* nagy kópia számára) a biotikus mikrokozmoszok esetében volt pozitív rRNS szinten. Ez a *Dehalococcoides* taxon – melynek tagjai képesek a klóretének eténé váló metabolikus degradációjára (Maymo-Gatell és mtsai 1997, Holliger és mtsai 1999) - nagy abundanciájára és kulcs szerepére utal. Feltételeztük, hogy a TCE c-DCE-vé való hatékony degradációjában a *D. chloroethenica* is fontos szerepet játszik, míg a c-DCE tovább bontásáért (pl. biotikus mikrokozmoszok) a *Dehalococcoides* sp. lehet felelős (Fennell és mtsai 2001, Hendrickson és mtsai 2002). Hasonló eredményeket publikáltak Lu és munkatársai (2009). A vízmintákban a deklorinációs végtermékek százalékos eloszlását összevetettük a *Dehalococcoides* DNS kimutatásokkal. Ahol etén volt a végtermék, ott tudtunk *Dehalococcoides* DNS-t detektálni, míg ahol VC volt a végtermék, a *Dehalococcoides* DNS nem volt kimutatható.

A kémiai vizsgálatok, a taxon- és funkció specifikus kimutatások azt mutatták, hogy **minden mikrokozmoszban megvolt a lehetőség a TCE teljes, eténig történő degradációjára, de az acetát adagolás mérsékelte a közösségi lebontást.** Ezt később a T-RFLP molekuláris ujjlenyomat eredmények is alátámasztottak. **Jelentős csökkenést figyeltünk meg a mikrokozmoszok bakteriális diverzitásában minden mikrokozmosz esetében és a deklorináló baktériumok kisselektálódását** (pl. *Dehalococcoides* sp. és *Sulfurospirillum halorespirans*). A fő T-RF csúcsok taxonómiai azonosítása a kiindulási inokulum rRNS bakteriális közösségéből készült 195-tagú klónkönyvtár alapján történt (8. táblázat). **A biotikus mikrokozmoszban, ahol a TCE biodegradációja eténig történt meg, a fő csúcs *AluI* emésztést követően a 130 bp-os volt, mely a *Dehalococcoides* sp.-nek feleltethető meg.** Az acetát kezelésű mikrokozmoszban a fő csúcs a 113 bp-os volt, amely a *S. halorespirans*-nak feleltethető meg. Ez a mikroorganizmus a TCE részleges degradációjára képes, és a TCE c-DCE redukzív deklorinációs lépésben vesz részt (Luijten és mtsai 2003). Ez a két fő T-RF volt a meghatározó az egyes mikrokozmosz közösségek elválásában RNS alapon, ami egyértelműen összhangban van a kémiai eredményekkel. Továbbá, utalva a

relatív T-RF csúcs alatti területekre RNS alapon, a kiindulási mintában a *S. halorespirans* és a *Dehalococcoides* sp. aránya 15,8:4,3% volt. Az acetát kezelésű mikrokozmoszok esetében ez az arány 32,5:0,3% volt, míg a biotikus kontroll esetében 2,4:29,7%. Ezek az adatok is megerősítik, hogy a különböző szerkezetű bakteriális közösségek teljesen különböző dehalogenációs képességekkel jellemezhetőek. Hasonló megfigyeléseket publikáltak Maillard és munkatársai (2011), akik egy SL2 jelzésű dúsító kultúrát vizsgáltak (többféle módszerrel, köztünk T-RFLP-vel is). Ez a kultúra *Sulfurospirillum* spp.-t és *Dehalococcoides* spp.-t tartalmazott. Két fő T-RF-et figyeltek meg három különböző tenyésztésben, az éppen zajló deklorinációs lépéstől függően. A relatív csúcs alatti területek 42:24%-nak adódtak, utalva a *Dehalococcoides* spp.:*Sulfurospirillum* spp. arányra, abban a kultúrában ahol a PCE eténig bomlott, 0:93%-nak, ott ahol a PCE c-DCE-ig bomlott és 64:21%-nak abban a dúsítóban, ahol a c-DCE bomlott eténig.

A molekuláris biológiai módszerek a molekuláris ujjlenyomat eredményekkel együtt igazolták a *Dehalococcoides* sp. dúsítását etén termeléssel párhuzamosan a biotikus kontrollokban, míg az acetát kezelt mikrokozmoszokban csak részleges deklorinációt figyeltünk meg *S. halorespirans* dominanciával.

A laboratóriumi mikrokozmosz kísérletek értékes eredményeket szolgáltatottak egy *in situ* bioremediációs beavatkozás tervezéséhez, és igazolták a három-fázisú mikrokozmoszok szükségességét ahhoz, hogy autentikusabban tudjuk követni az *in situ* zajló mikrobiális folyamatokat.

IX. Összefoglalás

A klórozott szénhidrogének okozta talajvíz szennyezések súlyos környezeti károkat okoznak világszerte. A szennyeződések felszámolásának egyik módja lehet a bioremediációs eljárások alkalmazása. Egy hatékony *in situ* bioremediációs technika kifejlesztéséhez előbb azonban részletesen ismernünk kell a deklorináló mikrobaközösséget.

A szénhidrogénnel szennyezett területek Bacteria közössége jól kutatott, ugyanakkor az Archaea közösségről ez nem mondható el. Az irodalomban nincs egyértelmű vélemény arról, hogy milyen szerepet töltenek be a deklorinációs folyamatokban. Vizsgálataink során az Archaea diverzitás-változást követtük nyomon egy *in situ* kármentesítés folyamán.

Mind ez idáig, a *Dehalococcoides* genus tagjai az egyetlen olyan ismert mikroorganizmusok, amelyek a klórozott eténeket eténné bontják így eltávolítva ezeket a gyakori talajvíz szennyezőket. Ezért tehát a természetes lebontási potenciál megbecsüléséhez fontos ezeknek a kulcs mikroorganizmusoknak és redukzív dehalogenáz (RDáz) génjeinek taxonómiai és funkcionális diverzitásának jellemzése szennyezett területeken. Vizsgálatunkban, megbecsültük a *Dehalococcoides* sp. és három RDáz gén diverzitását talajvízben, mesterséges lápban és mikrokozmoszban. Megbecsültük a Pinellas és a Cornell alcsoportok előfordulását és relatív abundanciáját egy új direkt bázissorrend meghatározási módszerrel, amely megmutatta, hogy minden szekvencia azonos volt és a Pinellas alcsoportéhoz tartozott. Ezzel szemben, funkció gén szinten eredményeink jelentős különbségeket mutattak az egyes rendszerek között. A vinil-klorid redukáz gének közül a *vcrA* gént a talajvízben, a mesterséges lápban és a mikrokozmoszokban tudtuk kimutatni, míg a *bvcA* gén csak a mesterséges láp és a mikrokozmosz mintákban detektáltuk. Vizsgálataink kimutatták, hogy annak ellenére, hogy a vizsgált rendszerekből származó *Dehalococcoides* 16S rRNS gén szekvenciák azonosak voltak, az RDáz gén

diverzitás a jelenlévő klórozott eténeknek megfelelően változott az egyes rendszerekben.

Egy új, molekuláris módszert fejlesztettünk, ami „primer meghosszabbodás” (SNUPE) módszerén alapult. Célunk, különböző dehalogenáz gének kimutatása volt, dúsító kultúrákban. Az egyes dúsító kultúrákhoz különböző elektron donorokat adagoltunk és beoltottuk egy olyan kultúrával, ami nagy százalékban tartalmazott *Dehalococcoides* szervezeteket és a klórozott szénhidrogéneket eténig bontotta.

Háromfázisú mikrokozmosz kísérleteket végeztünk, melynek során a triklóretén biodegradációjának serkentését vizsgáltuk és meghatároztunk a legígéretesebb, a bioremediáció során bevethető elektron donort. A mikrokozmosz kísérletek során az acetátot, mint szén és energiaforrást és a hidrogént, mint elektron donort alkalmaztuk. Előzetes kísérletek során, kétfázisú rendszerekben a TCE részleges degradációját tapasztaltuk, ami valószínűleg a tapadási felület hiányával és ezáltal a biofilm képzés nehézségeivel volt magyarázható. Ezért talajt alkalmaztunk biztosítva ezzel a megfelelő felületet a baktériumok megtelepedéséhez. Mikrokozmosz kísérletünkben TCE egészen vinil-kloridig bomlott acetát adagolás során, míg a biotikus kontrollokban etén felszabadulást detektáltunk a 220. napra. A T-RFLP rámutatott, hogy a TCE lebontás a különböző mikrokozmoszokban különböző dehalogénező közösséget eredményezett, ahol VC volt a végtermék, ott *Sulfurospirillum halorespirans* dominanciával, ahol pedig etén volt a végtermék, ott *Dehalococcoides* sp. dominanciát detektáltunk.

X. Summary

Chlorinated hydrocarbons are causing serious environmental damages worldwide. Stimulation of dechlorinating microorganisms is potentially the most promising method for remediating contaminated sites. However, to develop an efficient *in situ* bioremediation technique, the dechlorinating community should be well studied.

Bacterial community of contaminated sites is well explored, but about the Archaea community our knowledge is incomplete. There is no general agreement about their function in the dechlorination processes. The aim of this study was to examine the Archaeal community changes in the *in situ* biostimulation process.

Thus far, members of the genus *Dehalococcoides* are the only microorganisms known to dehalogenate chlorinated ethenes to ethene and thereby detoxify these common groundwater pollutants. Therefore, it is important to characterise the taxonomic and functional diversity of these key microorganisms and their reductive dehalogenase (RDase) genes in contaminated aquifers for assessing the natural attenuation potential. Here, we evaluated the diversity of *Dehalococcoides* sp. and three RDase genes in groundwater as well as in water from a constructed wetland and microcosms. The presence and relative abundance of Pinellas and Cornell subgroups of *Dehalococcoides* was evaluated by a novel direct sequencing method, which revealed that all sequences were identical and affiliated to the Pinellas subgroup. Contrarily, our results showed remarkable differences at the functional gene level between the systems. Our study demonstrates that although the *Dehalococcoides* 16S rRNA gene sequences retrieved from the investigated systems were identical, the RDase gene diversity varied among the systems, according to the spectrum of the chlorinated ethenes present.

A new molecular approach based on single-nucleotide primer extension (SNuPE) was designed to detect the expression of different groups of putative

dehalogenases in an enrichment culture dominated by *Dehalococcoides*. This culture originated from contaminated groundwater and degrades (among others) chlorinated ethenes to ethene.

Three-phase microcosm experiments were set up to investigate the enhancement of TCE biodegradation and to identify the most promising electron donor for *in situ* bioremediation. Acetate as carbon and energy source and hydrogen as electron donor were tested in microcosm experiments. Previous studies showed only partial dechlorination of TCE in a two-phase system due to the absence of adhesion surface and the difficulty of biofilm formation. Therefore soil was used to ensure adequate surface for the settlement of bacteria. In our microcosms TCE was degraded to vinyl-chloride with added acetate, while in the case of the biotic control ethylene production was detected by day 220. T-RFLP revealed that TCE enrichment resulted in different dechlorinating communities with the dominance of *Sulfurospirillum halorespirans* in the microcosms where VC was the end product, and with the dominance of *Dehalococcoides* sp. where the dechlorination ended in ethene.

XI. Melléklet

A klónozás részletes leírása

Az alábbi összetevőket mértük össze 0,5 ml-es csövekbe: 5 µl 2x ligáló puffer, 1 µl pGEM®-T Easy klónozó vektor, 3 µl PCR termék, 1 µl T4 DNS ligáz és 10 µl dH₂O. Pipettával összekevertük és egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk.

Az *Escherichia coli* JM 103 szuperkompetens sejteket felolvasztottuk, majd jégen 50 µl-t átmértünk egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe. Hozzáértünk 2 µl-t a ligálási reakció-elegyből. Ezután jégre helyeztük 20 percre, majd a reakcióelegyet 50 másodperces hó sokknak tettük ki 42°C-on. Ezt követően 2 percig inkubáltuk jégen, majd 950 µl SOC tápközeget adtunk hozzá és 1,5 órán át rázattuk 37°C-on. Steril szélesztőbottal 100 µl-eket szélesztettünk a transzformált sejteket tartalmazó oldatból X-gal és IPTG-t tartalmazó LB-ampicillin agarra. A táplemezeket egy éjszakán át inkubáltuk 37°C -os termosztátban. A vektor felvételével a gazdasejtek rezisztenciát nyernek ampicillinre, az inzert beépülésével pedig megszűnik a β-galaktozidáz aktivitás. Azon telepek, amelyeknek megvan ez az aktivitása, nem hordoznak inzertet, és képesek a táplemezben lévő X-gal hasítására, ami kék színű festéket eredményez. A negatív telepek ezért kékek, a pozitívak pedig fehérek. A pozitív, beépült fragmentumot tartalmazó kolóniákat steril fogpiszkáló segítségével leszedtük, 30 µl dH₂O-ben felfuszpendáltuk. A sejteket 98°C-on, 3 percig inkubáltuk, majd 3 percig centrifugáltuk.

LB tápleves (literenként)

10 g Bacto®-tripton
5 g Bacto®-élesztő kivonat
5 g NaCl
1 l desztillált víz
pH 7.0

LB lemez ampicillinnel

15 g agart adtunk 1 liter LB tápleveshez, sterilizáltuk (autoklávban, 15 percig, 121°C-on és 1 atm nyomáson). Amint a tápleves lehűlt kb. 50°C hőmérsékletűre, hozzáadtuk az ampicillint 100 µg/ml végső koncentrációban. Kb. 30-35 ml táplevest öntöttünk 85 mm-es Petri csészébe.

Hagytuk az agart megszilárdulni. 4°C-on a lemezek egy hónapig, míg szobahőmérsékleten 1 hétig tárolhatók.

SOC tápleves (100 ml)

2.0 g Bacto®-tripton
0,5 g Bacto®-élesztő kivonat
1 ml 1M NaCl
0,25 ml 1M KCl
1 ml 2M Mg²⁺ törzsoldat, sterilizált
1 ml 2M glükóz, sterilizált
desztillált víz

A Bacto®-triptont, a Bacto®-élesztő kivonatot, a NaCl-ot és a KCl-ot hozzáadtuk 97 ml desztillált vízhez. Jól elkevertük, autoklávoztuk (15 percig, 121°C-on és 1 atm nyomáson), majd szobahőmérsékletűre hűtöttük. Hozzáadtuk a 2M Mg²⁺ törzsoldatot és 2M glükóz oldatot, mindkettőt 20 mM végső koncentrációban. Ezután 100 ml-re egészítettük ki az oldatot steril, desztillált vízzel. A pH-t 7.0-ra állítottuk be.

2M Mg²⁺ törzsoldat

20,33 g MgCl₂·6H₂O
24,65 g MgSO₄·7H₂O
desztillált víz
100 ml desztillált vízben oldottuk fel a komponenseket, majd szűréssel sterilizáltuk.

Zinder szintetikus tápközeg (literenként)

0,5 g NH₄Cl
0,4 g K₂HPO₄
0,1 g MgCl₂·2H₂O
0,05 g CaCl₂·2H₂O
10 ml nyomelem oldat
1 ml rezazurin (1 g/l)
desztillált víz

Nyomelemoldat (literenként)

4,5 g Nitrilecetsav

0,556 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,086 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0,17 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0,21 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,019 g H_3BO_3

0,02 g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0,01 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

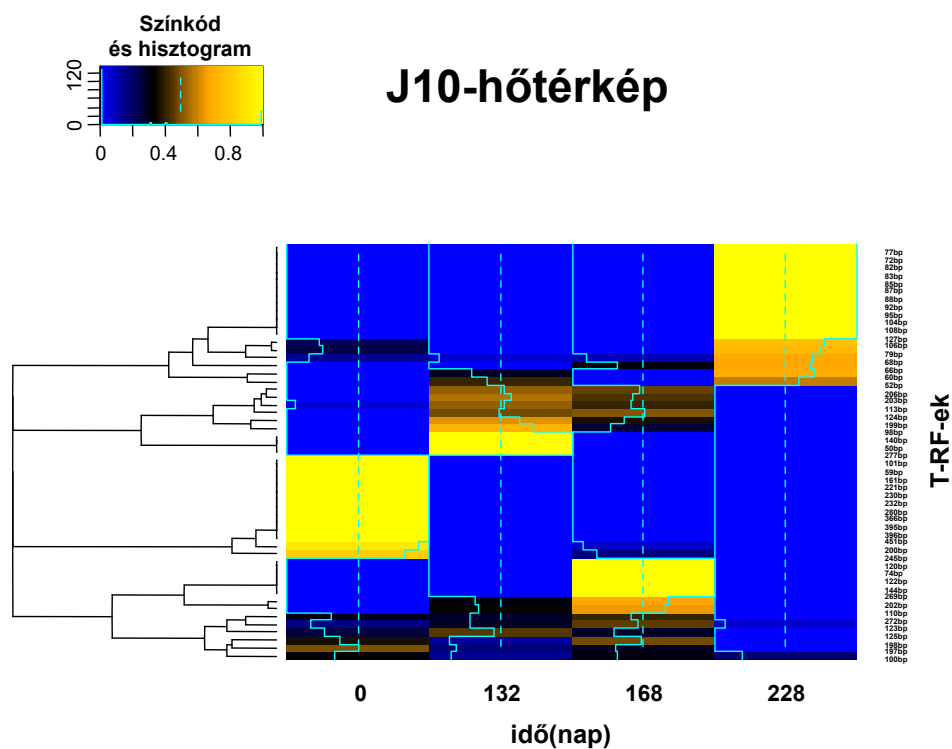
5 mg $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

5 mg SeO_2

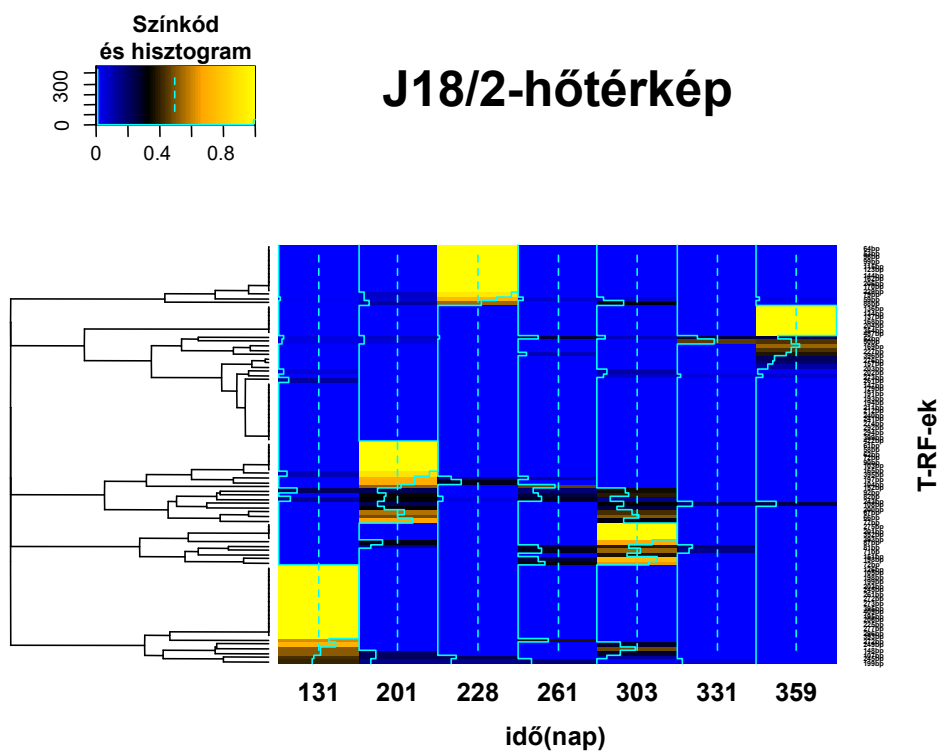
5 mg NaWO_4

1. **táblázat.** Jarque-Bera teszt eredménye a kémiai paraméterek normál eloszlásának vizsgálatára az Archaea diverzitás-vizsgálatok során

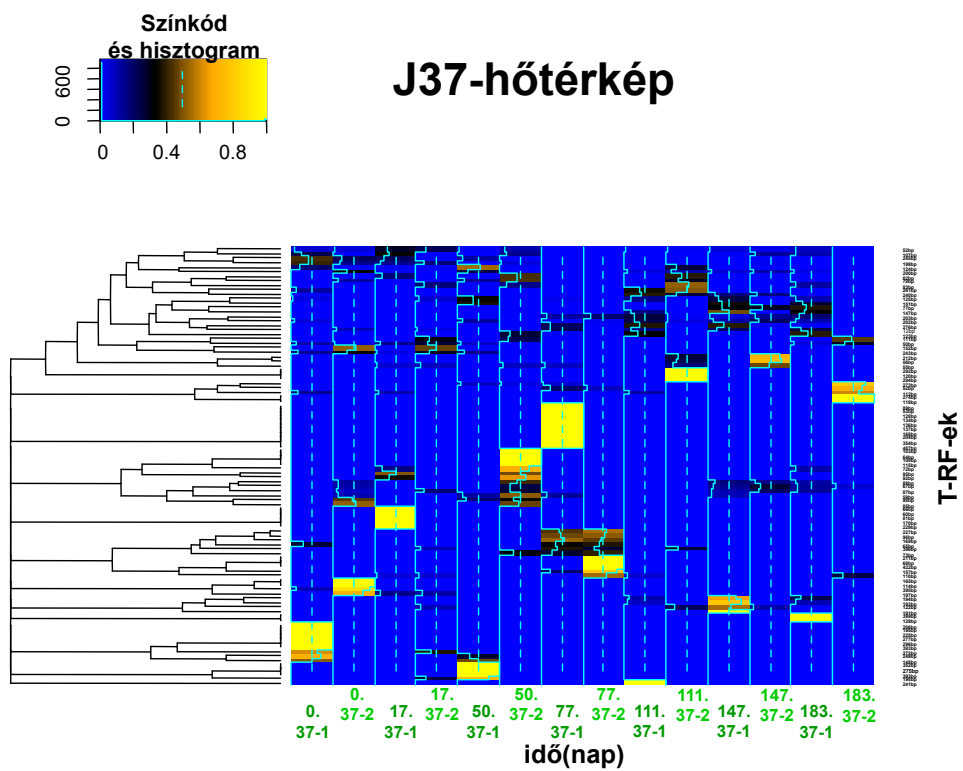
	pH	szulfát	oldott vas	oldott mangán	TOC
J10	0,7367	0,8037	0,7185	0,7546	0,8315
J18/2	0,6877	0,7465	0,7902	0,6735	0,8091
J37	0,4204	0,3679	0,4557	0,5423	0,6033



1. ábra A J10 minta hőterkép elemzése a legabundánsabb T-RF-ek vizsgálatára.



2. ábra A J18/2 minta hőterkép elemzése a legabundánsabb T-RF-ek vizsgálatára.



3. ábra A J37 minta hő térkép elemzése a legabundánsabb T-RF-ek vizsgálatára.

2. táblázat A *Dehalococcoides* diverzitáshoz alkalmazott talajvíz minták szennyezés vizsgálatának eredménye.

	Eredet (lásd 8. ábra)	Etén (µg/l)	VC (µg/l)	t-DCE (µg/l)	c-DCE (µg/l)	TCE (µg/l)	PCE (µg/l)	Benzol (µg/l)	Toluol (µg/l)	Referenciák
Talajvíz	588 (talajvíz az 588/589 mikrokozmoszokhoz)	<50	<5	<2	1	<0,2	<0,2	<0,5	<0,5	
	589 (talajvíz az 588/589 mikrokozmoszokhoz)	<50	<5	<2	<0,5	1	<0,2	9,5	0,6	
	1241	526	4324	3666	15964	11595	21643	17,1	20,2	Nijenhuis és mtsai 2007
	3051	456	8287	4496	29145	14	≤1	7627	14,0	Imfeld és mtsai 2008
	5261	988	2147	1508	3415	100	5	7652	303	Imfeld és mtsai 2010
	3062	105	193	66	333	539	4	6,81	<0,1	Imfeld és mtsai 2011
	ML-d7 (többszintű kút, 36.5 mbS)	43,3	37,8	18,1	65,9	23,0	2,53	2,52	<0,1	
	ML-d4 (többszintű kút, 19.5 mbS)	<0,8	<5,0	4,82	50,5	0,74	<0,10	0,26	<0,1	
	BMH	20,9±29,4	255±98	284±36	1062±64	2,5±1,0	0,5±0,1	26,3±10	<0,1	
Mesterséges lép	BMH-WL									
	(víz minták a mesterséges lép rendszerből, c- és t-DCE szennyezőkkel)	30,6±32,6	257,4±186,7	258±98,6	1069±260	<0,1	<0,1	<0,1	<0,10	Imfeld és mtsai 2010

3. táblázat. Az új módszer fejlesztéshez összeállított dúsító kultúrák klórozott szénhidrogén és etén mérésének eredményei. 1.1 – 1.5 VC az elektron akceptor, 2.1 – 2.5 PCE az elektron akceptor, 3.1 – 3.5 TCE az elektron akceptor, 4.1 – 4.5 c-DCE az elektron akceptor, minden esetben 1-3-ig az inokulált mikrokozmoszokat 4-5-ig pedig a negatív, abiotikus kontrollokat tüntettük fel.

Idő (nap)	1.1						1.2						1.3						1.4						1.5					
	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén
3	0	0	0	364,70	364,70	1,89	0	0	0	303,92	303,92	1,53	0	0	0	403,38	403,38	1,41	0	0	0	320,50	320,50	0	0	0	0	125,99	125,99	0
10	0	0	0	361,94	361,94	1,93	0	0	0	323,26	323,26	5,55	0	0	0	422,72	422,72	1,66	0	0	0	326,02	326,02	0	0	0	0	475,22	475,22	0
20	0	0	0	323,26	323,26	2,55	0	0	0	269,38	269,38	16,71	0	0	0	400,62	400,62	1,94	0	0	0	298,39	298,39	0	0	0	0	464,17	464,17	0
28	0	0	0	337,07	337,07	3,31	0	0	0	257,23	257,23	34,11	0	0	0	408,91	408,91	2,20	0	0	4,09	301,16	305,25	0	0	0	0,53	456,64	456,64	0
38	0	0	0,52	359,16	359,70	7,00	0	0	0,13	51,11	51,24	164,08	0	0	0,10	419,96	420,96	3,19	0	0	0,14	393,92	394,96	0	0	0	0	450,35	450,35	0
42	na	na	na	na	na	na	0	0	0	206,39	206,39	165,07	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
47	0	0	0	323,26	323,26	23,07	0	0	0	42,00	42,00	251,58	0	0	0	381,28	381,28	7,43	0	0	0	287,34	287,34	0	0	0	0	436,54	436,54	0
54	0	0	0	247,00	247,00	43,65							0	0	0	364,70	364,70	15,11	0	0	0	284,58	284,58	0	0	0	0	436,54	436,54	0
66	0	0	0	9,28	9,28	183,96							0	0	0	331,55	331,55	41,67	0	0	0	284,58	284,58	0	0	0	0	433,78	433,78	0
Idő (nap)	2.1						2.2						2.3						2.4						2.5					
	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén
3	115,84	0	0	0	115,84	0,62	182,81	0	0	0	182,81	0,99	184,69	0	0	0	184,69	0,95	100,80	0	0	0	100,80	0	208,89	0	0	0	208,89	0
10	317,21	0	0	0,42	317,63	1,57	279,61	0	0	0,28	279,89	1,64	274,91	0	0	0	274,91	1,46	129,70	0	0	0	129,70	0	314,86	0	0	0	314,86	0
20	277,26	0	0	0,55	277,82	1,59	249,07	0	0	0,31	249,38	1,65	244,37	0	0	0	244,37	1,49	113,73	0	0	0	113,73	0	289,01	0	0	0	289,01	0
28	242,02	0	0	0,56	242,58	1,52	212,41	0	6,17	0,30	218,88	1,63	208,42	0	0	0	208,42	1,41	106,44	0	0	0	106,44	0	237,32	0	0	0	237,32	0
38	239,67	1,23	0,11	0,54	241,54	1,56	199,25	0	0	0,29	199,55	1,58	195,96	0	0,11	0	196,08	1,43	104,09	0	0	0	104,09	0	233,80	0	0	0	233,80	0
42	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
47	185,63	24,89	0,12	0,53	211,16	1,55	167,30	1,46	2,09	0	170,84	1,59	185,86	0	0	0	185,86	1,47	90,23	0	0	0	90,23	0	205,60	0	0	0	205,60	0
54	90,93	130,38	0,28	0,70	222,29	1,51	148,27	6,76	0	0	155,02	1,65	172,47	0,95	0	0	173,42	1,44	88,82	0	0	0	88,82	0	189,62	0	0	0	189,62	0
66	0	207,20	2,82	0,91	210,93	1,51	101,74	39,15	0	0	140,89	1,69	149,68	4,58	0	0	154,26	1,45	75,19	0	0	0	75,19	0	164,95	0	0	0	164,95	0
Idő (nap)	3.1						3.2						3.3						3.4						3.5					
	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén
3. nap	4,61	277,37	0	0	281,98	1,02	0	413,66	0	0	413,66	1,67	0	376,73	0	0	376,73	1,51	0	454,29	0	0	454,29	0	0	398,89	0	0	398,89	0
10. nap	2,58	472,76	0	0	475,34	1,74	0	421,05	4,26	0	425,31	1,85	0	398,89	0	0	398,89	1,78	0	472,76	0	0	472,76	0	0	417,35	0	0	417,35	0
20. nap	5,43	406,27	0	0	411,70	1,61	1,00	316,89	17,75	2,14	337,78	1,75	0	346,07	0	0	346,07	1,69	0	417,35	0	0	417,35	0	0	369,34	0	0	369,34	0
28. nap	4,32	380,42	0	0	384,74	1,61	1,62	257,06	50,42	24,59	333,69	3,15	0	306,92	0	0	306,92	1,72	0	376,73	0	0	376,73	0	0	328,71	0	0	328,71	0
38. nap	2,34	402,58	1,28	0	406,20	1,69	0	118,93	62,71	132,34	313,98	40,77	0	301,38	1,09	0	302,47	1,75	0	319,11	0	0	319,11	0	0	320,59	0	0	320,59	0
42. nap	na	na	na	na	na	na	0	513,38	78,30	148,64	740,33	70,60	0	775,61	1,03	0	776,64	1,68	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
47. nap	4,14	366,39	0,72	0	371,24	1,64	0	350,50	126,90	219,10	696,50	107,40	0	746,07	1,28	0	747,34	1,72	0	325,76	0	0	325,76	0	0	292,52	0	0	292,52	0
54. nap	3,74	368,60	1,12	0	373,46	1,66	1,33	153,28	92,47	317,73	564,81	232,69	0	709,13	2,74	0,43	712,31	1,77	0	313,20	0	0	313,20	0	0	294,36	0	0	294,36	0
66. nap	0	341,64	5	0	346,16	1,58	0	4,65	0	5,00	9,65	563,82	0	583,56	41,31	0,39	625,26	1,83	0	286,24	0	0	286,24	0	0	262,60	0	0	262,60	0
Idő (nap)	4.1						4.2						4.3						4.4						4.5					
	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén	PCE	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC	etén
3. nap	3,35	0	526,52	0	531,87	1,55	1,92	0	481,27	0	483,19	1,53	0,668	0	504,22	0	504,89	1,64	0	0	535,27	0	535,27	0	0	0	512,99	0	512,99	0
10. nap	0	3,21	596,69	0,52	600,42	1,75	0	1,76	564,29	0,46	566,51	1,89	0	0,99	519,74	0	520,73	1,78	0	0	589,27	0	589,27	0	0	0	528,52	0	528,52	0
20. nap	0	2,37	556,19	1,45	560,01	1,68	0	1,20	564,29	1,28	566,77	1,83	0	1,12	539,99	1,46	542,56	1,75	0	0,97	573,07	0	574,04	0	0	0	518,39	0	518,39	0
28. nap	0	2,69	515,69	1,96	520,34	1,68	0	1,43	492,74	1,51	495,68	1,73	0	0,95	499,49	2,16	502,60	1,77	0	0	522,44	0	522,44	0	0	0	471,82	0	471,82	0
38. nap	0	1,13	527,17	4,64	532,94	1,77	0	0	511,64	2,90	514,54	1,86	0	0	506,24	5,94	512,18	1,90	0	0	537,97	0	537,97	0	0	0	503,54	0	503,54	0
42. nap	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
47. nap	0	3,45	498,82	11,83	514,09	2,66	0	1,54	469,12	6,58	477,23	1,95	0	1,18	485,99	20,33	507,51	2,39	0	0,71	487,34	0	488,05	0	0	0	463,04	0	463,04	0
54. nap	0	3,92	510,97	21,27	536,16	3,82	0	1,78	476,54	12,63	490,95	2,16	0	1,13	454,27	77,08	532,48	4,11	0	0,83	512,32	0	513,15	0	0	0	490,72	0	490,72	0
66. nap	0	3,99	448,19	45,04	497,22	6,28	0	1,84	427,27	32,88	461,98	2,86	0	1,07	174,82	350,89	526,79	62,25	0	0	465,74	0	465,74	0	0	0	450,89	0	450,89	0

4. táblázat A háromfázisú mikrokozmoszokhoz felhasznált talaj kémiai paramétereinek összegzése.

Változó	Egység	Érték	Módszer
pH	-	6.8	EPA 9045B
Teljes foszfor	mg/kg	694	EPA 3051:1996, EPA 6010B:1996
Teljes nitrogén	mg/l	160	MSZ EN 12260:2004
Teljes szerves szén	% (w/w)	21	
Teljes szervesetlen szén	% (w/w)	14	DIN ISO 10694
Teljes szén	% (w/w)	34	
Szerves (huminsav) tartalom	% (w/w)	61.75	MSZ 08-0012-6:1987

5. táblázat A 16S rRNS alapú dehalogénező baktériumok kimutatásához használt taxon-specifikus primerek összegzése.

Kimutatott taxon	Primer	Szekvencia (5'-3')	Referencia
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> (DD)	DD-F	GGACGAACGGCAGGTATGAAAA	<i>El Fantroussi és mtsai 1997*</i>
	DD-R	CATGTTTCCACAGGATTCTATGG	
<i>Dehalobacter restrictus</i> (DR)	DR-F	GTTAGGGAAGAACGGCATCTGT	<i>Smits és mtsai 2004*</i>
	DR-R	CATATCTCTACGGGATTAGTTGG	
<i>Desulfomonile tiedjei</i> (DT)	DT-F	GGGTCAAAGTCGGCCTCTCGACG	<i>El Fantroussi és mtsai 1997</i>
	DT-R	GAAGAGGATCGTGTTCACGA	
<i>Desulforomonas chloroethenica</i> (DCE)	DCE-F	AACCTTCGGGTCCTACTGTC	<i>Löffler és mtsai 2000</i>
	DCE-R	GCCGAAGTACCCCTATGTT	

*módosított

6. táblázat A redukzív dehalogenáz gének kimutatásához használt primerek összegzése.

Reduktív dehalogenáz gén	Primer	Szekvencia (5'-3')	Referencia
<i>tceA</i>	797f	ACGCCAAAGTGCCAAAAGC	<i>Magnuson és mtsai 2000</i>
	2490r	TAATCTATTCCATCCTTTCTC	
<i>bvcA</i>	<i>bvcAF</i>	TGCCTCAAGTACAGGTGGT	<i>Krajmalnik-Brown és mtsai 2004</i>
	<i>bvcAR</i>	ATTGTGGAGGACCTACCT	
<i>vcrA</i>	<i>vcrAf</i>	TGCTGGTGGCGTTGGTGCTCT	<i>Müller és mtsai 2004</i>
	<i>vcrAr</i>	TGCCCCGTCAAAGTGGTAAAG	

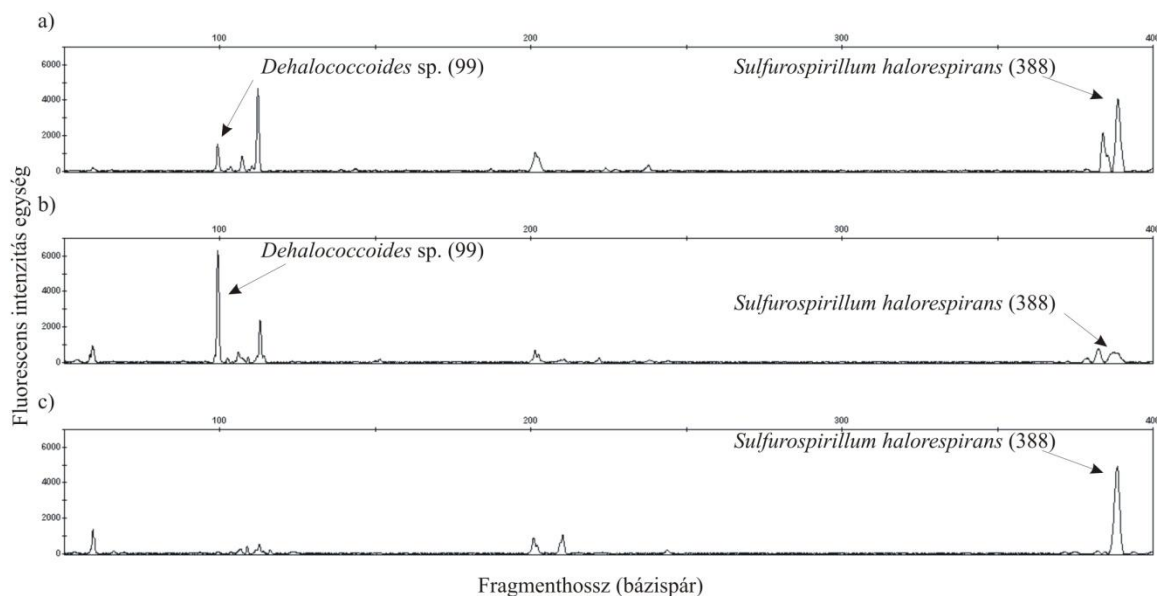
7. táblázat A TCE és bomlástermékeinek koncentrációja a háromfázisú mikrokozmoszokban.

Idő (nap)	Abiotikus kontroll				Biotikus kontroll				Acetát kezelt mikrokozmosz				
	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC*	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC*	etén	TCE	c-DCE	VC	SUM VOC*
	(μmol/l)	(μmol/l)	(μmol/l)	(μmol/l)	(μmol/l)	(μmol/l)	(μmol/l)	(μmol/l)	(μmol/l)	(μmol/l)	(μmol/l)	(μmol/l)	(μmol/l)
6	308,17	2,73	0	311	267,23	34,22	0	301	0	16,33	270,90	0	287
20	166,18	0	0	166	0,27	185,53	0	186	0	0,66	270,91	0	272
50	191,22	0	0	191	0,72	186,94	0	188	0	0,48	243,39	0	244
58	nd.	nd.	nd.	nd.	232,96	268,78	0	502	0	228,28	235,30	0	464
62	nd.	nd.	nd.	nd.	8,66	464,72	0	473	0	0,97	536,90	0	538
87	182,24	0	0	182	1,36	528,66	0	530	0	0,43	586,69	0	587
91	nd.	nd.	nd.	nd.	269,60	509,25	0	779	0	261,36	545,04	0	806
115	nd.	nd.	nd.	nd.	6,32	958,95	12,66	978	0	0	1278,56	0,72	1279
122	nd.	nd.	nd.	nd.	437,02	887,90	18,77	1344	0	599,43	977,16	1,31	1578
143	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	0	1218,34	2,99	1221
177	239,55	0	0	240	0	957,59	203,40	1161	0	0	1298,70	10,85	1310
203	nd.	nd.	nd.	nd.	0	564,77	518,10	1083	1,93	0	1293,00	42,07	1335
220	nd.	nd.	nd.	nd.	18,72	486,62	827,40	1333	4,21	0	1446,86	76,10	1523

*SUM VOC: összes illékony szerves vegyület

8. táblázat A gázkromatográfiás módszer ellenőrzésére végzett hét mérésből álló koncentrációmeghatározás eredményei.

	Szórás (μmol/l)	Variációs koefficiens	Kimutatási határ (μmol/l)	Meghatározási határ (μmol/l)
TCE	0,66	8,88	1,98	6,63
c-DCE	0,23	3,36	0,70	2,35
VC	0,05	2,94	0,14	0,47
metán	0,05	1,89	0,15	0,49
etén	0,03	1,88	0,08	0,26
etán	0,03	1,87	0,08	0,26



4. **ábra** A közösségi T-RFLP analízis eredménye a háromfázisú mikrokozmoszokban. Az rRNS minták közösségi kromatogramjai *Bsh*1236I endonukleázzal való emésztés után (a) a kiindulási mintában, (b) a biotikus mintában a 220. napon, (c) acetáttal kezelt mikrokozmoszban a 220. napon.

XII. Hivatkozások jegyzéke

- Abbott, W. 1966. Microcosm studies on estuarine water I. The replicability of microcosms. *Water pollution Control Federation* 38, 258-270.
- Adrian, L., Rahnenführer, J., Gobom, J., Hölscher, T. 2007. Identification of a chlorobenzene reductive dehalogenase in *Dehalococcoides* sp. strain CBCB1. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 7717-7724.
- Ahn, Y.B., Rhee, S.K., Fennell, D.E., Kerkhof, L.J., Hentschel, U., Häggblom, M.M. 2003. Reductive dehalogenation of brominated phenolic compounds by microorganisms associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4159-4166.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.
- Aulenta, F., Majone, M., Verbo, P., Tandoi, V. 2002. Complete dechlorination of tetrachloroethene to ethene in presence of methanogenesis and acetogenesis by an anaerobic sediment microcosm. *Biodegradation* 13, 411-424.
- Aulenta, F., Rossetti, S., Majone, M., Tandoi, V. 2004. Detection and quantitative estimation of *Dehalococcoides* spp. in a dechlorinating bioreactor by a combination of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and kinetic analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 206-212.
- Aulenta, F., Bianchi, A., Majone, M., Papini, M. P., Potalivo, M., Tandoi V. 2005. Assessment of natural or enhanced *in situ* bioremediation at a chlorinated solvent-contaminated aquifer in Italy: a microcosm study. *Environment International* 21, 185-190.
- Bradley, P.M. 2003. History and ecology of chloroethene biodegradation: A review. *Bioremediation Journal* 7, 81-109.
- Chapman, S.W. és Parker, B.L. 2005. Plume persistence due to aquitard back diffusion following dense nonaqueous phase liquid source removal or isolation. *Water Resources Research* 41, W12411.
- Christ, J.A., Ramsburg, C.A., Abriola, L.M., Pennell, K.D., Löffler, F.E. 2005. Coupling aggressive mass removal with microbial reductive dechlorination for remediation of DNAPL source zones: A review and assessment. *Environmental Health Perspectives* 113, 465-477.
- Chung, J., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B.E. 2008. Bioreduction of trichloroethene using a hydrogen-based membrane biofilm reactor. *Environmental Science and Technology* 42, 477-483.
- Cichocka, D., Nikolausz M., Haest P. J., Nijenhuis I., 2010. Tetrachloroethene conversion to ethene by a *Dehalococcoides*-containing enrichment culture from Bitterfeld. *FEMS Microbiology Ecology* 72, 297-310.

- Culman, S.W., Bukowski, R., Gauch, H.G., Cadillo-Quiroz, H., Buckley, D.H. 2009. T-REX: Software for the Processing and Analysis of T-RFLP data. *BMC Bioinformatics* 10, 171.
- DeWeerd, K.A., Mandelco, L., Tanner, R.S., Woese, C.R., Suflita, J.M. 1990. *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium. *Archives of Microbiology* 154, 23-30.
- Dijk, J.A., Stams, A.J., Schraa, G., Ballerstedt, H., de Bont, J.A.M., Gerritse, J. 2003. Anaerobic oxidation of 2-chloroethanol under denitrifying conditions by *Pseudomonas stutzeri* strain JJ *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 68-74.
- Dugat-Bony, E., Biderre-Petit, C., Jaziri, F., David, M.M., Denonfoux, J., Lyon, D.Y., Richard, J-Y., Curvers, C., Boucher, D., Vogel, T.M., Peyretailade, E., Peyret, P. 2012. *In situ* TCE degradation mediated by complex dehalorespiring communities during biostimulation processes. *Microbial Biotechnology* 5, 642-653.
- Duhamel, M., Mo, K., Edwards, E.A. 2004. Characterization of a highly enriched *Dehalococcoides*-containing culture that grows on vinyl chloride and trichloroethene. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5538-5545.
- El Fantroussi, S., Mahillon, J., Naveau, H., Agathos, S.N. 1997. Introduction of anaerobic microcosms and nested-PCR monitoring. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 806-811.
- Elango, V.K., Liggenstoffer, A.S., Fathepure, B.Z. 2006. Biodegradation of vinyl chloride and cis-dichloroethene by a *Ralstonia* sp. strain TRW-1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72, 1270-1275.
- Euro Chlor, 1997. Euro Chlor risk assessment for the marine environment OSPARCOM region - North Sea; Tetrachloroethylene.
- Euro Chlor, 1999. Euro Chlor risk assessment for the marine environment OSPARCOM region - North Sea; Vinyl chloride.
- Fennell, D.E., Carroll, A.B., Gossett, J.M., Zinder, S.H., 2001. Assessment of indigenous reductive dechlorinating potential at a TCE-contaminated site using microcosms, polymerase chain reaction analysis, and site data. *Environmental Science and Technology* 35, 1830-1839.
- Fennell, E.D. és Gossett, J.M. 2003. Microcosms for site-specific evaluation of enhanced biological reductive dehalogenation. In: Häggblom, M.M. and Bossert, I.D. (Eds.) *Dehalogenation: Microbial processes and environmental applications*. Norwell: Kluwer Academic Publishers, pp. 3-29.
- Ferri, L., Perrin, E., Campana, S., Tabacchioni, S., Taccetti, G., Cocchi, P., Ravenni, N., Dalmastri, C., Chiarini, L., Bevivino, A., Manno, G., Mentasti, M., Fani, R. 2010. Application of multiplex single-nucleotide primer extension (mSNuPE) to the identification of bacteria: The *Burkholderia cepacia* complex case. *Journal of Microbiological Methods* 80, 251-256.
- Fries, M., Forney, L., Tiedje, J.M. 1997. Phenol- and toluene-degrading microbial populations from an aquifer in which successful trichloroethene cometabolism occurred. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1523-1530.
- Friis, A.K., Kofoed, J.L.L., Heron, G., Albrechtsen, H-J., Bjer, P.L. 2007. Microcosm evaluation of bioaugmentation after field-scale thermal treatment of a TCE-contaminated aquifer. *Biodegradation* 18, 661-674.

- Futagami, T., Goto, M., Furukawa, K. 2008. Biochemical and genetic bases of dehalorespiration. *The chemical record* 8, 1-12.
- Futagami, T., Okamoto, F., Hashimoto, H., Fukuzawa, K., Higashi, K. Nazmul Hussain Nazir, K.H.M., Wada, E., Suyama, A., Takegawa, K., Goto, M., Nakamura, K., Furukawa, K. 2011. Enrichment and characterization of a trichloroethene-dechlorinating consortium containing multiple „*Dehalococcoides*” strains. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75, 1268-1274.
- Griffith, G., Cole, J., Quensen, J.F., Tiedje, J.M. 1992. Specific deuteration of dichlorobenzoate during reductive dehalogenation by *Desulfomonile tiedjei* in D2O. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 409-411.
- Habash, M.B., Trevors, J.T., Lee H. 2004. Bacterial reductive dehalogenases. In: A. Singh and O.P. Ward (Eds.), *Biodegradation and Bioremediation* (pp. 198-233), New York: Springer.
- Hafenbradl, D., Keller, M., Dirmeier, R., Rachel, R., Rossnagel, P., Burggraf, S., Huber, H., Stetter, K.O. 1996. *Ferroglobus placidus* gen. nov, sp. nov, a novel hyperthermophilic archaeum that oxidizes Fe²⁺ at neutral pH under anoxic conditions. *Archives of Microbiology* 166, 308-314.
- Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, 9.
- Hartmans, S. és de Bont, J. 1992. Aerobic vinyl chloride metabolism in *Mycobacterium aurum* L1. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1220-1226.
- Häggblom, M.M., Bossert, I.D. 2003. Halogenated organic compounds - A global perspective. In: Häggblom, M.M. and Bossert, I.D. (Eds.) *Dehalogenation: Microbial processes and environmental applications*. Norwell: Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 3-29.
- He, J., Sung, Y., Dollhopf, M.E., Fathepure, B.Z., Tiedje, J.M., Löffler, F.E. 2002. Acetate versus hydrogen as direct electron donors to stimulate the microbial reductive dechlorination process at chloroethene-contaminated sites. *Environmental Science and Technology* 36, 3945-3952.
- He, J., Ritalahti, K.M., Aiello, M.R., Löffler, F.E. 2003. Complete detoxification of vinyl chloride by an anaerobic enrichment culture and identification of the reductively dechlorinating population as a *Dehalococcoides* species. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 996-1003.
- He, J., Sung, Y., Krajmalnik-Brown, R., Ritalahti, K.M., Löffler, F.E. 2005. Isolation and characterization of *Dehalococcoides* sp. strain FL2, a trichloroethene (TCE)- and 1,2-dichloroethene-respiring anaerobe. *Environmental Microbiology* 7, 1442-50.
- He, J., Holmes, V.F., Lee, P.K.H., Alvarez-Cohen, L. 2007. Influence of Vitamin B₁₂ and cocultures on the growth of *Dehalococcoides* isolates in defined medium. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2847-2853.
- Heidrich S., Weiss H., Kaschl A. 2004. Attenuation reactions in a multiple contaminated aquifer in Bitterfeld (Germany). *Environmental Pollution* 129, 277-288.
- Hendrickson, E.R., Payne, J.A., Young, R.M., Starr, M.G., Perry, M.P., Fahnestock, S., Ellis, D.E., Ebersole, R.C., 2002. Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal

- DNA from chloroethene contaminated sites throughout North America and Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 485–495.
- Henry, B.M. 2010. Biostimulation for anaerobic bioremediation of chlorinated solvents In: Stroo, H.F. and Ward, C.H. (Eds.) *In Situ Remediation of chlorinated solvent plumes*. Springer Science+Business Media, LLC 2010, New York, pp. 357–423.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington E.M. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gelelectrophoresis separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3233–3241.
- Hill, M.O., és Gauch, H.G. 1980. Detrended correspondence analysis: an improved ordination technique. *Vegetatio* 42, 47–58.
- Holliger, C., Hahn, D., Harmsen, H., Ludwig, W., Shumacher, W., Tindall, B., Vazquez, F., Weiss, N., Zehnder, A.J.B. 1998. *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration. *Archives of Microbiology* 169, 313–321.
- Holliger, C., Wohlfarth, G., Diekert, G. 1999. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 22, 383–398.
- Holmes, V.F., He, J., Lee, P.K.H., Alvarez-Cohen, L. 2006. Discrimination of multiple *Dehalococcoides* strains in a trichloroethene enrichment by quantification of their reductive dehalogenase genes. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5877–5883.
- Hungenholz, P. 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology* 3, 0003.1–0003.8.
- Imfeld, G., Nijenhuis, I., Nikolausz, M., Zeiger, S., Pachke, H., Drangmeister, J., Grossmann, J., Richnow, H.H., Weber, S., 2008. Assessment of in situ degradation of chlorinated ethenes and bacterial community structure in a complex contaminated groundwater system. *Water Research* 42, 871–882.
- Imfeld, G., Aragonés, C.E., Fetzer, I., Mészáros, É., Zeiger, S., Nijenhuis, I., Nikolausz, M., Delerce S., Richnow H.H. 2010. Characterization of microbial communities in the aqueous phase of a constructed model wetland treating 1,2-dichloroethene-contaminated groundwater. *FEMS Microbiology Ecology* 72, 74–88.
- Imfeld, G., Pieper, H., Shani, N., Rossi, P., Nikolausz, M., Nijenhuis, I., Paschke, H., Weiss, H., Richnow, H.H. 2011. Characterization of groundwater microbial communities, dechlorinating bacteria, and in situ biodegradation of chloroethenes along a vertical gradient. *Water, Air, & Soil Pollution* 221, 107–122.
- Iwamoto, T., Tani, K., Nakamura, K., Suzuki, Y., Kitagawa, M., Eguchi, M., Nasu, M. 2000. Monitoring impact of *in situ* biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. *FEMS Microbiology Ecology* 32, 129–141.
- Jarque, C., Bera, A. 1987. A test for normality of observations and regression residuals. *International Statistical Review* 55, 163–172.
- Kao, C.M., Chen, Y.L., Chen, S.C., Yeh, T.Y., Wu, W.S. 2003. Enhanced PCE dechlorination by biobarrier systems under different redox conditions. *Water Research* 37, 4885–4894.

- Kao, C.M. és Prosser, J. 1999. Intrinsic bioremediation of trichloroethylene and chlorobenzene: field and laboratory studies. *Journal of Hazardous Materials* 69, 67-79.
- Kaufhold, T., Smidt, M., Cichocka, D., Nikolausz, M., Nijenhuis, I. 2013. Dehalogenation of diverse halogenated substrates by a highly enriched *Dehalococcoides*-containing culture derived from the contaminated mega-site in Bitterfeld. *FEMS Microbiology Ecology* 83, 176-188.
- Kielhorn, J., Melber, C., Wahnschaffe, U. Aitio, A., Mangelsdorf, I. 2000. Vinyl chloride: still a cause for concern. *Environmental Health Perspectives* 108, 579-588.
- Krajmalnik-Brown, R., Hölscher, T., Thomson, I.N., Saunders, F.M., Ritalahti, K.M., Löffler, F.E. 2004. Genetic identification of a putative vinyl chloride reductase in *Dehalococcoides* sp. strain BAV1. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6347-6351.
- Krajmalnik-Brown, R., Sung, Y., Ritalahti, K.M., Saunders, F.M., Löffler, F.E. 2007. Environmental distribution of the trichloroethene reductive dehalogenase gene (*tceA*) suggests lateral gene transfer among *Dehalococcoides*. *FEMS Microbiology Ecology* 59, 206-214.
- Krook, A., Stratton, I.M., O'Rahilly, S. 1992. Rapid and simultaneous detection of multiple mutations by pooled and multiplex single-nucleotideprimer extension: application to the study of insulin-responsive glucose transporter and insulin receptor mutations in non-insulin-dependent diabetes. *Human Molecular Genetics* 1, 391-395.
- Krumholz, L.R. 1997. *Desulfuromonas chloroethenica* sp. nov. uses tetrachloroethylene and trichloroethylene as electron acceptors. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 1262-1263.
- Kube, M., Beck, A., Zinder, S.H., Kuhl, H., Reinhardt, R., Adrian, L. 2005. Genome sequence of the chlorinated compound-respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1. *Nature Biotechnology* 23, 1269-1273.
- Kuppuswamy, M.N., Hoffmann, J.W., Kasper, C.K., Spitzer, S.G., Groce, S.L., Bajaj, S.P. 1991. Single-nucleotideprimer extension to detect genetic diseases: Experimental application to hemophilia B (factor IX) and cystic fibrosis genes. *PNAS* 88, 1143-1147.
- Lane D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Eds.) *Nucleid Acid Techniques in Bacterial Systematics* (pp. 115-173.) New York: Wiley.
- Lee, M.D., Odom, J.M., Buchanan Jr., R.J. 1998. New perspectives on microbial dehalogenation of chlorinated solvents: Insight from the field. *Annual Review of Microbiology* 52, 423-452.
- Lee, P.K.H., Johnson, D.R., Holmes, V.F., He, J., Alvarez-Cohen, L. 2006. Reductive dehalogenase gene expression as a biomarker for physiological activity of *Dehalococcoides* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 6161-6168.
- Lee, P.K.H., Macbeth, T.W., Sorenson, K.S., Jr., Deeb, R.A., Alvarez-Cohen, L. 2008. Quantifying genes and transcripts to assess the in situ physiology of

- "*Dehalococcoides*" spp. in a trichloroethene-contaminated groundwater site. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2728-2739.
- Lendvay, J.M., Löffler, F.E., Dollhopf, M., Aiello, M.R., Daniels, G., Fathepure, B.Z., Gebhard, M., Heine, R., Helton, R., Shi, J., Krajmalnik-Brown, R., Major, C.L., Barcelona, M.J., Petrovskis, E., Hickey, R., Tiedje, J.M., Adriaens, P. 2003. Bioreactive barriers: a comparison of bioaugmentation and biostimulation for chlorinated solvent remediation. *Environmental Science & Technology* 37, 1422-1431.
- Leps, J. és Smilauer, P. 2003. Multivariate analysis of ecological data using CANOCO™. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 50-51.
- Li, Q., Liu, Z., Monroe, H., Cuiat, C.T. 2002. Integrated platform for detection of DNA sequence variants using capillary array electrophoresis. *Electrophoresis* 23, 1499-1511.
- Lovley, D.R., Goodwin, S. 1988. Hydrogen concentrations as an indicator of the predominant terminal electron accepting reactions in aquatic sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 52, 2993-3003.
- Lovley, D.R. 2003. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nature Reviews, Microbiology* 1, 35-44.
- Löffler, F.E., Tiedje, J.M., Sanford, R.A. 1999. Fraction of electrons consumed in electron acceptor reduction and hydrogen thresholds as indicators of halorespiratory physiology. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4049-4056.
- Löffler, F.E., Sun, Q., Li, J., Tiedje, J.M. 2000. 16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene (PCE)-dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* species. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1369-1374.
- Löffler, F.E. és Edwards, E.A. 2006. Harnessing microbial activities for environmental cleanup. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 274-284.
- Löffler, F.E., Yan, J., Ritalahti, K.M., Adrian, L., Edwards, E.A., Konstantinidis, K.T., Müller, J.A., Fullerton, H., Zinder, S.H., Spormann, A.M. 2013. *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligate organohalide-respiring anaerobic bacteria, relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidetes* classis nov., within the phylum *Chloroflexi*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 625-635.
- Luijten, M.L.G.C., de Weert, J., Smidt, H., Boschker, H.T.S., de Vos, W.M., Schraa, G., Stams, A.J.M. 2003. Description of *Sulfurospirillum halorespirans* sp. nov., an anaerobic, tetrachloroethene-respiring bacterium, and transfer of *Dehalospirillum multivorans* to the genus *Sulfurospirillum* as *Sulfurospirillum multivorans* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 787-793.
- Magli, A., Wendt, M., Leisinger, T. 1996. Isolation and characterization of *Dehalobacterium formicoaceticum* gen nov sp nov, a strictly anaerobic bacterium utilizing dichloromethane as source of carbon and energy. *Archives of Microbiology* 166, 101-108.
- Magnuson, J.K., Romine, M.F., Burris, D.R., Kingsley, M.T. 2000. Trichloroethene reductive dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: sequence of *tceA* and substrate range characterization. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 5141-5147.
- Maillard, J., Schumacher, W., Vazquez, F., Regeard, C., Hagen, W.R., Holliger, C. 2003. Characterization of the corrinoid iron - sulfur protein tetrachloroethene

- reductive dehalogenase of *Dehalobacter restrictus*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4628-4638.
- Maillard, J., Charnay, M-P., Regeard, C., Rohrbach-Brandt, E., Rouzeau-Szynalski, K., Rossi, P., Holliger, C. 2011. Reductive dechlorination of tetrachloroethene by a stepwise catalysis of different organohalide respiring bacteria and reductive dehalogenases. *Biodegradation* 22, 949-960.
- Major, D.W., McMaster, M.L., Cox, E.E., Edwards, E.A., Dworatzek, S.M., Hendrickson, E.R., Starr, M.G., Payne, J.A., Buonamici, L.W. 2002. Field demonstration of successful bioaugmentation to achieve dechlorination of tetrachloroethene to ethene. *Environmental Science & Technology* 36, 5106-5116.
- Mattes, T.E., Alexander, A.K., Richardson, P.M., Munk, A.C., Han, C.S., Stothard, P. Coleman, N.V. 2008. The genome of *Polaromonas* sp. strain JS666: Insights into the evolution of a hydrocarbon- and xenobiotic-degrading bacterium, and features of relevance to biotechnology. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 6405-6416.
- Maymo-Gatell, X., Tandoi, V., Gossett, J.M., Zinder, S.H. 1995. Characterisation of an H₂-utilizing anaerobic enrichment culture that reductively dechlorinates tetrachloroethene to vinyl chloride and ethane in complete absence of methanogenesis and acetogenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3928-3933.
- Maymo-Gatell, X., Chien, Y-T., Gossett, J.M., Zinder, S.H. 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* 276, 1568-1571.
- Maymo-Gatell, X., Anguish, T., Zinder, S.H. 1999. Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2-dichloroethane by "*Dehalococcoides ethenogenes*" 195. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3108-3113.
- Mátyás, G., Giunta, C., Steinmann, B., Hossle, J.P., Hellwig, R. 2002. Quantification of single-nucleotide polymorphisms: a novel method that combines primer extension assay and capillary electrophoresis. *Human mutation* 19, 58-68.
- McCarty, P.L. 2010. Groundwater contamination by chlorinated solvents: history, remediation technologies and strategies In: Stroo, H.F. and Ward, C.H. (Eds.) *In Situ Remediation of chlorinated solvent plumes*. Springer Science+Business Media, LLC 2010, New York, pp. 1-28.
- Mészáros, É. 2007. Halogénezett alifás szénhidrogének által szennyezett talajvizek Archaea diverzitásának vizsgálata. Szakdolgozat. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológiai Intézet, Mikrobiológiai Tanszék
- Mészáros, É., Cebe, G., Mohr, A., Romsics, Cs., Márialigeti, K., Sipos, R. 2011. Complex molecular biological investigation of TCE-contaminated microcosms to reveal microbial community changes with respect to electron donor amendments *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 58 (Suppl), 76.
- Miller, E., Wohlfarth, G., Diekert, G. 1998. Purification and characterization of the tetrachloroethene reductive dehalogenase of strain PCE-S. *Archives of Microbiology* 169, 497-502.
- Moeseneder, M.M., Arrieta, J.M., Muyzer, G., Winter, C., Herndl, F.J. 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for

- complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3518-3525.
- Mohr, A. 2006. Klórozott szénhidrogénekkal szennyezett talajvizek bakteriális közösségének elemzése, új bioremediációs technológia fejlesztése. Szakdolgozat. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológiai Intézet, Mikrobiológiai Tanszék
- Moran, M.M., Zogorski, J.S., Squillace, P.J. 2007. Chlorinated solvents in groundwater of the United States. *Environmental Science and Technology* 41, 74-81.
- Morris, R.M., Fung, J.M., Rahm, B.G., Zhang, S., Freedman, D.L., Zinder, S.H. and Richardson R.E. 2007. Comparative proteomics of *Dehalococcoides* spp. reveals strain-specific peptides associated with activity. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 320-326.
- Morse, J.J., Allemna, B.C., Gossett, J.M., Zinder, S.H., Fennell, D.E. 1998. A treatability test for evaluating the potential applicability of the reductive anaerobic biological *in situ* treatment technology (RABITT) to remediate chloroethenes.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.
- Müller, J.A., Rosner, B.M., von Abendroth, G., Meshulam-Simon G., McCarty, P.L., Spormann, A.M. 2004. Molecular identification of the catabolic vinyl chloride reductase from *Dehalococcoides* sp. strain VS and its environmental distribution. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4880-4888.
- Nemzeti Környezetügyi Intézet, www.neki.gov.hu
- Neumann, A., Scholz-Muramuatsu, H., Diekert, G. 1994. Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans*. *Archives of Microbiology* 162, 295-301.
- Ni, S., Fredrickson, J.K., Xun, I. 1995. Purification and characterization of a novel 3-chlorobenzoate-reductive dehalogenase from the cytoplasmic membrane of *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. *Journal of Bacteriology* 177, 5135-5139.
- Nijenhuis, I., Nikolausz, M., Köth, A., Felföldi, T., Weiss, H., Drangmeister, J., Grossmann, J., Kästner, M., 2007. Assessment of the natural attenuation of chlorinated ethenes in an anaerobic contaminated aquifer in the Bitterfeld/Wolfen area using stable isotope techniques, microcosm studies and molecular biomarkers. *Chemosphere* 67, 300-311.
- Nikolausz, M., Chatzinotas, A., Palatinszky, M., Imfeld, G., Martinez, P., Kästner, M. 2008. Single-nucleotidePrimer Extension assay for detection and sequence typing of „*Dehalococcoides*“ spp. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 300-304.
- Nikolausz, M., Chatzinotas, A., Táncsics, A., Imfeld, G., Kästner, M. 2009. Evaluation of Single-nucleotidePrimer Extension for detection and typing of phylogenetic markers used for investigation of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2850-2860.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, H.H., Wagner, H. 2014. Package „vegan”: Community ecology package. <http://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>

- Palatinszky, M., Nikolausz, M., Sváb, D., Márialigeti, K. 2011. Preferential ligation during TA-cloning of multitemplate PCR products – A factor causing bias in microbial community structure analysis. *Journal of Microbiological Methods* 85, 131-136.
- Pastinen, T., Partanen, J., Syvänen, A.C. 1996. Multiplex, fluorescent, solid-phase minisequencing for efficient screening of DANN sequence variation. *Clinical Chemistry* 42, 1391-1397.
- Piggee, C.A., Muth, J., Carrilho, E., Karger, B.L. 1997. Capillary electrophoresis for the detection of known point mutations by single-nucleotide primer extension and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography* 781, 367-375.
- Podani, J. 1997. Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeltárás rejtelmeibe, Scientia Kiadó, Budapest
- Pöritz, M., Goris, T., Wubet, T., Tarkka, M.T., Buscot, F., Nijenhuis, I., Lechner, U., Adrian, L. 2013. Genome sequences of two dehalogenation specialists – *Dehalococcoides mccartyi* strains BTF08 and DCMB5 enriched from the highly polluted Bitterfeld region. *FEMS Microbiology Letters* 2, 101-104.
- Pruesse, E., Peplies, J and Glöckner, FO 2012. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* 28 1823-1829.
- Puzder, T., Csáki, F., Gruiz, K., Horváth, Zs., Márton, T., Sajgó, Zs. 2001. Kármentesítési kézikönyv 4., Kármentesítési technológiák. Környezetvédelmi Minisztérium, Budapest
- R Development Core Team. 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. URL <http://www.R-project.org>
- Ramette, A. 2007. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 62, 142-160.
- Révész, S., Sipos, R., Kende, A., Rikker, T., Romsics, C., Mészáros, É., Mohr, A., Táncsics, A., Márialigeti, K. 2006. Bacterial community changes in TCE biodegradation detected in microcosm experiments. *International Biodeterioration and Biodegradation* 58, 239-247.
- Richardson, R.E., Bhupathiraju, V.H., Song, D.L., Goulet, T.A., Alvarez-Cohen, L. 2002. Phylogenetic characterization of microbial communities that reductively dechlorinated TCE based upon a combination of molecular techniques. *Environmental Science and Technology* 36, 2652-2662.
- Ritalahti, K.M., Amos, B.K., Sung, Y., Wu, Q., Koenigsberg, S.S., Löffler, F.E. 2006. Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple *Dehalococcoides* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2765-2774.
- Rudi, K., Skulber, O.M., Larsen, F., Jakobsen, K.S. 1998. Quantification of toxic Cyanobacteria in water by use of competitive PCR followed by sequence-specific labelling of oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2639-2643.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41(D1), D590-D596.

- Sanford, R.A., Cole, J.R., Löffler, F.E., Tiedje, J.M. 1996. Characterization of *Desulfitobacterium chlororespirans* sp. nov., which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3800-3808.
- Saitou, N. és Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
- Shyu, C., Soule, T., Bent, S.J., Foster, J.A., Forney, L.J. (2007) MiCA: A web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes. *Journal of Microbial Ecology* 53, 562-570.
- Siebert, A., Neumann, A., Schubert, T., Diekert, G. 2002. A non-dechlorinating strain of *Dehalosporillum multivorans*: evidence for a key role of the corrinoid cofactor in synthesis of an active tetrachloroethene dehalogenase. *Archives of Microbiology* 178, 443-449.
- Sipos, R., Székely, A.J., Palatinszky, M., Révész, S., Márialigeti, K., Nikolausz, M. 2007. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 60, 341-350.
- Sipos, R., Mészáros, É., Cebe, G., Mohr, A., Pál, R., Romsics, Cs., Márialigeti, K. 2011. Complex molecular biological investigation of TCE biodegradation with respect to electron donor amendments using anaerobic microcosms. In: Sterflinger, K. and Pinar, G. (Eds.) IBBS-15 Abstract Book, pp. 235.
- Smidt, H., van Leest, M., van der Oost, J., de Vos, W.M. 2000. Transcriptional regulation of the *cpr* gene cluster in ortho-chlorophenol-respiring *Desulfitobacterium dehalogenans*. *Journal of Bacteriology* 182, 5683-5691.
- Smidt, H. és de Vos, W.M. 2004. Anaerobic microbial dehalogenation *Annual Review of Microbiology* 58, 43-73.
- Smits, T.H.M., Devenoges C., Szynalski, K., Maillard, J., Holliger C. 2004. Development of a real-time PCR method for quantification of the three genera *Dehalobacter*, *Dehalococcoides*, and *Desulfitobacterium* in microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* 57, 369-378
- Sobrinho, B., Brion, M., Carracedo, A. 2005. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International* 154, 181-194.
- Sokolov, B.P. 1990. Primer extension technique for the detection of single-nucleotide in genomic DNA. *Nucleic Acids Research* 18, 3671.
- Sung, Y., Ritalahti, K.M., Sanford, R.A., Urbance, J.W., Flynn, S.J., Tiedje, J.M., Löffler, F.E. 2003. Characterization of two tetrachloroethene-reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2964-2974.
- Sung, Y., Ritalahti, K.M., Apkarian, R.P., Löffler, F.E. 2006. Quantitative PCR confirms purity of strain GT, a novel trichloroethene-to-ethene-respiring *Dehalococcoides* isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1980-1987.
- Syvänen, A.C. 1999. From gels to chips: "minisequencing" primer extension for analysis of point mutations and single-nucleotide polymorphisms. *Human mutation* 13, 1-10.

- Syvänen, A.C. 2001. Accessing genetic variation: genotyping single-nucleotide polymorphisms. *Nature reviews* 2, 930-942.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.
- Tas, N., van Eekert, M.H.A., de Vos, V.M., Smidt, H. 2009. The little bacteria that can – diversity, genomics and ecophysiology of ‘*Dehalococcoides*’ spp. in contaminated environments. *Microbial Biotechnology* 3, 389-402.
- Táncsics, A. 2009. Aromás szénhidrogének lebontásában résztvevő mikroba közösségek vizsgálata a funkciógének alapján. Doktori disszertáció. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológiai Intézet, Mikrobiológiai Tanszék
- Táncsics, A., Farkas, M., Szoboszlai, S., Szabó, I., Kukolya, J., Vajna, B., Kovács, B., Benedek, T., Kriszt, B. 2013. One-year monitoring of *meta*-cleavage dioxygenase gene expression and microbial community dynamics reveals the relevance of subfamily 1.2.C extradiol dioxygenases in hypoxic, BTEX-contaminated groundwater. *Systematic and Applied Microbiology* 36, 339-350.
- Traunecker, J., Preuss, A., Diekert, G. 1991. Isolation and characterization of a methyl-chloride utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Archives of Microbiology* 156, 416-421.
- Tully, G., Sullivan, K.M., Nixon, P. Stones, R.E., Gill, P. 1996. Rapid detection of mitochondrial sequence polymorphisms using multiplex solid-phase fluorescent minisequencing. *Genomics* 34, 107-113.
- US EPA 2002. “Engineered approaches to in situ bioremediation of chlorinated solvents: fundamentals and field applications.”
- Utkin, I., Woese, C., Wiegel, J. 1994. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 612-619.
- Vajna, B. 2010. A bacterium közösségek változásának jellemzése molekuláris módszerekkel a laskagomba-alapanyag gyártás során: A T-RFLP adatfeldolgozás optimalizálása és alkalmazása. Doktori disszertáció. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológiai Intézet, Mikrobiológiai Tanszék
- Vallone, P.M., Just, R.S., Coble, M.D., Butler, J.M., Parsons, T.J. 2004. A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *International Journal of Legal Medicine* 118, 147-157.
- van de Pas, B.A., Smidt, H., Hagen, W.R., van der Oost, J., Schraa, G., Stams, A.J.M., de Vos, W.M. 1999. Purification and molecular characterization of *ortho*-chlorophenol reductive dehalogenase, a key enzyme of halo-respiration in *Desulfitobacterium dehalogenans*. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 20287-20292.
- Vaneechoutte, M., Rossau, R., De Vos, P., Gillis, M., Janssens, D., Paepe, N., De Rouck, A., Fiers, T., Claeys, G., Kersters, K. 1992. Rapid identification of bacteria of

- the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Letters* 93, 227-234.
- Verge, M.F., Ulrich, R.L., Freedman, D.L. 2000. Characterization of an isolates that uses vinyl chloride as a growth substrate under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3535-3542.
- Wagner, A., Adrian, L., Kleinstuber, S., Andreesen, J.R., Lechner, U. 2009. Transcription analysis of genes encoding homologues of reductive dehalogenases in „*Dehalococcoides*“ sp. strain CBDB1 by using terminal restriction fragment length polymorphism and quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 1876-1884.
- Waller, A.S., Krajmalnik-Brown, R., Löffler, F.E., Edwards, E.A. 2005. Multiple reductive-dehalogenase-homologous genes are simultaneously transcribed during dechlorination by *Dehalococcoides*-containing cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 8257-8264.
- Wang, X., Ito, S., Sawaguchi, A., Sawaguchi, T. 2006. Analysis of single-nucleotide polymorphisms and its application in a disputed paternity case. *International Congress Series* 1288, 76-78.
- Wu, J-H. és Liu, W-T. 2007. Quantitative multiplexing analysis of PCR-amplified ribosomal RNA genes by hierarchical oligonucleotide primer extension reaction. *Nucleic Acids Research* 35, e82.
- Wycisk P., Weiss H., Kaschl A., Heidrich S., Sommerwerk K 2003. Groundwater pollution and remediation options for multisource contaminated aquifers (Bitterfeld/Wolfen, Germany). *Toxicology Letters* 140-141, 343-351.
- Yang, Y. és McCarty, P.L. 1998. Competition for hydrogen within a chlorinated solvent dehalogenating anaerobic mixed culture. *Environmental Science and Technology* 32, 3591-3597
- Zinder, S.H., 1998. Methanogens. In: RS Burlage, R Atlas, D Stahl, G Geesey & G Sayler, (Eds.) *Techniques in Microbial Ecology* (pp. 113-136) New York: Oxford University Press.

XIII. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom

Márialigeti Károly témavezetőmnek, hogy a Mikrobiológiai Tanszéken lehetőséget adott dolgozatom elkészítésére, de legfőképpen támogatásáért és iránymutatásáért.

Révész Sára és Romsics Csaba korábbi témavezetőimnek, hogy bevezettek a bioremediációs eljárások illetve a molekuláris módszerek rejtelseibe. A „TCE labor” munkatársainak, különösen Sipos Ritának és Varga Karolinának az együttműködés örömeért és az anaerob rendszerben való tevékenykedés könnyebb elviseléséért.

Pál Róbertnek a gázkromatográfiás eljárások megismertetéséért, a sok-sok együtt ötletelésért, segítőkészségéért.

Nikolausz Marcellnek, Ivonne Nijenhuisnak és Gwenaél Imfeldnek, a lipcsei UFZ munkatársainak, hogy megismertették velem, hogyan is kell bánni a rendkívül érzékeny *Dehalococcoides*-kel és a cikkírásban nyújtott segítségükért.

Doktorandusztársaimnak, főként Vajna Baláznak, Homonnay Zalánnak, Pohner Zsuzsannának és Gorál Róbertnek a problémákon való együtt gondolkodásért és „az inkubációs idők” kellemes eltöltéséért.

Az ELTE Mikrobiológiai Tanszék összes munkatársának, akik valamilyen módon segítettek munkámat.

Az ELTE Környezettudományi Doktori Iskola jelenlegi és egykori vezetőinek, Kiss Ádámnak, Kis Keve Tihamérnak, Jánosi Imrének és Ács Évának, hogy lehetővé tették részvételemet a Környezetbiológiai doktori programban.

Puskás Judit barátnőmnek az angol nyelvű szövegeim fáradhatatlan és alapos lektorálásáért.

Végül, de nem utolsósorban családomnak, páromnak és barátaimnak támogatásukért, mérhetetlen türelmükért, és legfőképp azért, hogy mindig bíztak abban, hogy egyszer eljön az a pillanat, amikor a 142. oldal végére is pont kerül.

A dolgozat az alábbi kutatási és ösztöndíj pályázatok támogatásával valósulhatott meg: GVOP-3.1.1.-2004-05-0407/3.0, OTKA K-75790, TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KMR-2010-0003, Marie Curie – AXIOM MEST-CT-2004-8332, SMWK (Staatsministerium für Wissenschaft und Kunst).